

Chemische Veränderungen an den funktionellen Gruppen des Kollagens

MANFRED v. WILM

1965



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555228_0002



Chemische Veränderungen
an den funktionellen Gruppen des Kollagens

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Manfred v. Wilm
am
5. Februar 1965

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Graßmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 23.6.1965
23.6.1965

FÜR MEINE MUTTER

Herrn Prof. W. Graßmann,

meinem verehrten Lehrer, bin ich für Themenstellung, zahlreiche Diskussionen und Kritik, sowie für die gewährte finanzielle Unterstützung zu grösstem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. H. Hörmann,

danke ich gleichfalls sehr herzlich für die jederzeit gern gewährten Anregungen und Hinweise. Seine langjährige Erfahrung auf dem Gebiet der Kollagenchemie hat mir bei der Durchführung dieser Arbeit sehr geholfen.

Während meiner Tätigkeit am Max-Planck-Institut für Eiweiss- und Lederforschung in München wurde ich durch eine Reihe von Mitarbeitern des Institutes mit Rat und Tat unterstützt. Ich möchte nicht versäumen, auch ihnen an dieser Stelle meinen Dank auszusprechen.

Herrn Prof. K. Kühn danke ich für die Einführung in Theorie und Praxis der Elektronenmikroskopie. Herrn Dr. K. Hannig und seinem Laboratorium habe ich für die Anleitung zur Durchführung elektrophoretischer Trennungen, sowie für die Ausführung quantitativer Aminosäureanalysen zu danken. Herr Dipl. phys. G. Beier war an der Interpretation der UZ-Versuche massgeblich beteiligt.

Meiner Frau danke ich für die mühevollen Anfertigung des Manuskriptes.

Inhaltsübersicht

	Seite
A. <u>Einleitung</u>	
I. Allgemeines über Kollagen	1
II. Quervernetzungen und funktionelle Gruppen des Kollagens	5
III. Aufgabenstellung	13
B. <u>Ergebnisse</u>	
I. Versuche zur elektronenmikroskopischen Lokalisierung der ϵ -Aminogruppen im Kollagen	15
1. Acylierungsmittel	15
a) S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid	15
b) Dithiodiglykolsäure-Dichlorid	16
c) Cyclisches Anhydrid der Dithiodiglykolsäure	16
2. Reaktionen an den Modellsubstanzen	17
a) n-Butylamin	17
b) α -N-Benzoyl-DL-Lysin	22
3. Reaktionen am Kollagen	23
Umsetzung von Sehnenkollagen mit	
a) S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid	25
b) Dithiodiglykolsäure-Dichlorid	25
c) Dithiodiglykolsäure-Anhydrid	28
d) Elektronenmikroskopische Untersuchungen	29
4. Diskussion der Ergebnisse	30
II. Zur Frage der Beteiligung von ϵ -Aminogruppen an der Quervernetzung	33
1. Restbasenbestimmung an dinitrophenyliertem nativem und denaturiertem Tropokollagen und Kollagen	34
2. Diskussion der Ergebnisse	36
III. Methoden und Ergebnisse zur α -Aminoendgruppenbestimmung an Kollagen	38

	Seite
1. Methoden	38
a) Umsetzung von nativem und denaturiertem Tropokollagen und Kollagen mit Dinitrofluorbenzol	39
b) Schonende Hydrolyse in zwei Stufen	40
c) Säulenchromatographie der DNP-Aminosäuren an Polyamid	43
2. Ergebnisse	47
a) α -Aminoendgruppen von nativem und denaturiertem Tropokollagen und Kollagen	47
b) Quantitative Bestimmung der α -Aminoendgruppe von Rinderserum-Albumin (Kontrollversuch)	51
3. Diskussion der Ergebnisse	55
a) Zur Methode	55
b) Die Ergebnisse der α -Aminoendgruppen- bestimmung an Kollagen	56
IV. α -Aminoendgruppenbestimmungen an Kollagen nach Behandlung mit Pepsin und Perjodat-Harnstoff	58
α -Aminoendgruppenbestimmungen an	
1. Kälberkollagen nach Einwirkung von Pepsin	58
2. Rinderkollagen nach Auflösung durch Perjodat- Harnstoff	60
3. Diskussion der Ergebnisse	61
V. Untersuchungen an Kollagen nach Behandlung mit Hydroxylamin	62
Die Einwirkung von Hydroxylamin auf	
1. Kollagen in Gegenwart von Lithiumchlorid	63
2. Natives Tropokollagen	67
a) Elektronenmikroskopische Untersuchungen: Bildung von Fibrillen und Segmenten aus Tropo- kollagen nach Auflösung durch Hydroxylamin	68
b) Untersuchungen in der Ultrazentrifuge	69
c) α -Aminoendgruppenbestimmung an nativem Tropokollagen nach Behandlung mit Hydroxylamin	71

	Seite
3. Diskussion der Ergebnisse	73
VI. Zur Frage der Beteiligung von β - und γ -Carboxylgruppen der Asparagin-bezw. Glutaminsäure an Quervernetzungen	78
1. Methoden und Ergebnisse von Gallop et al.	79
2. Methodische Untersuchungen	80
a) Elektrophoretische Trennung von neutralen sowie stärker und schwächer basischen Aminosäuren	81
b) Ergänzende Untersuchungen zur Polyamid-chromatographie:	83
Trennung von Bis-DNP-Aminosäuren	
c) Trennung von Bis-DNP-Aminosäuren durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel	86
3. Versuche zur Nacharbeitung der Gallop'schen Ergebnisse unter zusätzlicher Anwendung eigener Methoden	86
a) Bildung und Dinitrophenylierung der Hydroxamsäuren in Kollagen, sowie Lossen'scher Abbau des Kollagen-Dinitrophenylhydroxamats	87
c) Analyse des nach Lossenabbau und Hydrolyse erhaltenen Aminosäuregemisches	89
4. Diskussion der Ergebnisse	96
VII. Elektronenmikroskopische Aufnahmen	98
C. <u>Schlussdiskussion</u>	
Die Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse für die Erforschung der Konstitution des Kollagens	104
D. <u>Experimenteller Teil</u>	
Zu Teil I	111
II	127

Zu Teil III	Seite 130
IV	134
V	136
VI	138
E. <u>Zusammenfassung der Ergebnisse</u>	139
F. <u>Literaturverzeichnis</u>	142

A. Einleitung

I. Allgemeines über Kollagen

Vorkommen und Bedeutung

Das Kollagen gehört zu den interessantesten und am gründlichsten untersuchten Faserproteinen. Es bildet als Gerüstsubstanz den Hauptbestandteil der Haut, der Sehnen, Knochen und Knorpel.

Für den Mediziner und Biologen ist es von Bedeutung wegen seiner Beteiligung an pathologischen Veränderungen des Bindegewebes, am biologischen Prozess des Alterns, sowie an der Heilung von Wunden durch Narbenbildung.

Der Industrie dient das Kollagen als wichtiges Ausgangsmaterial bei der Umwandlung von Haut in Leder durch den Gerbprozess und wegen seiner Verkochbarkeit zu Gelatine.

Aufbau und Struktur

Die chemische Analyse der Kollagenfaser ergibt einen hohen Gehalt an Glycin (etwa 30 Mol-%), Prolin und Hydroxyprolin (zusammen etwa 20 Mol-%). Durch die Anwesenheit von Hydroxyprolin und Hydroxylysin unterscheidet sich das Kollagen von allen anderen Eiweisskörpern.

Physikalisch-chemische Untersuchungen zeigen, dass die Einwirkung von Wasser, vor allem aber von Säuren und Alkalien zur Quellung der Faser führt, während Temperaturerhöhung über den Schrumpfungspunkt hinaus eine Denaturierung, d.h. eine Zerstörung der nativen Faserstruktur bewirkt. Röntgenstrukturanalysen ergaben ein charakteristisches Röntgen-diagramm (1).

Bei genauerer Betrachtung einer Kollagenfaser erkennt man, dass diese aus sehr feinen Fäserchen, den sogenannten Fibrillen, besteht; diese sind zu Bündeln zusammengefasst, die im Lichtmikroskop eben noch erkennbar sind und deren Durchmesser zwischen 100 und einigen 1.000 Å betragen kann. Betrachtet man gequollene oder längere Zeit im Elektronenmikroskop bestrahlte Fibrillen (2), so erweisen sich diese als aus feinsten, in der Längsrichtung orientierten Untereinheiten, den Filamenten, zusammengesetzt, deren Durchmesser 30 Å beträgt. Diese Filamente bestehen nun

ihrerseits wieder aus den kleinsten uns bekannten Bausteinen des Kollagens, den Protofibrillen, welche aus Tropokollagenmolekülen bestehen, die echte molekulare Gebilde darstellen. Nach Untersuchungen von Boedtker u. Doty (3) haben sie einen Durchmesser von etwa $14 \text{ \AA}$, eine Länge von $2.800 \text{ \AA}$ und ein Molekulargewicht von 360.000. Röntgenstrukturanalysen (4) zeigten, dass diese Protofibrillen aus drei seilartig umeinander gewundenen Polypeptidspiralen bestehen, die mit leichtem Rechtsdrall wiederum schraubenartig zur Struktur einer übergeordneten Helix verdrillt sind. Der Zusammenhalt der Polypeptidketten innerhalb der Protofibrille wird durch quer zur Faserachse verlaufende Wasserstoffbrücken zwischen NH-Gruppen einer Kette und dem Peptidsauerstoff einer zweiten Kette gewährleistet. Elektrostatische Kräfte zwischen den positiven und negativen Ladungen der Seitenketten basischer und saurer Aminosäuren bewirken den Zusammenhalt verschiedener Tropokollagenmoleküle. Dass die bei anderen Proteinen vorgefundene α -Helix im Kollagen nicht vorliegen kann, ergab sich sowohl aus der Tatsache, dass der hohe Anteil an Iminosäuren wie Prolin und Hydroxyprolin ein Zustandekommen von Wasserstoffbrücken längs der Faserachse unmöglich macht, als auch daraus, dass der sperrige, eine freie Drehbarkeit ausschliessende Pyrrolidinring eine andere Struktur erzwingt. Das heute allgemein gültige Strukturmodell des Kollagens nach Rich u. Crick (4) trägt diesen Besonderheiten Rechnung.

Im Elektronenmikroskop zeigt die Fibrille eine hochunterteilte charakteristische Querstreifung, deren Muster mit einer Periode von $640 \text{ \AA}$ wiederkehrt. Diese erstmals von F.O. Schmitt (5) und Wolpers (6) unabhängig voneinander aufgefundene Querstreifung wird durch Einlagerung von Verbindungen mit Schwermetallatomen, wie Phosphorwolframsäure (PWS), Uranylacetat (UAc) und Chrom III-Komplexen bedeutend verstärkt und kontrastreicher gestaltet. Nach "Anfärben" mit PWS lässt sich die Periode in günstigen Fällen in 13 - 14 dunkle Querstreifen unterteilen. Die feinsten, eben noch als solche erkennbaren Streifen sind etwa $15 \text{ \AA}$ breit. Auf diese Weise gelang es, mit dem Elektronenmikroskop bis in Bereiche von der Grössenordnung einiger Aminosäuren vorzustossen. Nach der zuerst von Bear (7) hypothetisch geforderten, später von Graßmann, Hannig (8) und Kühn (9) experimentell gesicherten

Deutung, wird das Zustandekommen dieser Querstreifung am besten dadurch erklärt, dass die dunklen Banden die ungeordneten Bereiche der Faser darstellen, in denen vorwiegend schwere und polare Aminosäuren mit sperrigen Resten angehäuft sind, während die hellen Querstreifen die geordneten Bereiche repräsentieren, die sich vorwiegend aus leichten, sich besser in eine kristalline Struktur fügenden Aminosäuren wie Glycin, Prolin und Oxyprolin zusammensetzen.

Eingehende Untersuchungen von Kühn, Graßmann und Hofmann (10) sowie von Kühn und Gebhardt (11) an Kollagen mit systematisch veränderten sauren und basischen Seitenketten haben gezeigt, dass das Phosphorwolframsäureanion von den basischen Gruppen, vor allem den Guanidogruppen des Arginins gebunden wird, während das Uranyl- und das Chrom III-Kation mit den sauren Resten - vor allem den freien Carboxylgruppen der Asparagin- und Glutaminsäure - reagiert.

Danach sind an bestimmten Stellen des Tropokollagenmoleküls vorwiegend basische, an anderen Stellen dagegen vorwiegend saure Aminosäuren angehäuft. Die beobachtete Kontrastverschärfung lässt sich auf ein "in Register bringen" der Polypeptidspiralen, also auf eine Fixierung und Verbesserung des in der Fibrille bereits vorgegebenen Ordnungszustandes zurückführen, wobei die Veränderung der Massendicke durch das Einlagern schwerer Metalle eine wesentlich geringere Rolle zu spielen scheint.

Das Tropokollagen

Während über die Biosynthese der Primärstruktur (103) des Kollagens noch wenig bekannt ist, ist das lösliche Monomere des Kollagens, das sogenannte Tropokollagen, sehr gut untersucht. Soweit Tropokollagen im Organismus noch in gelöster Form vorliegt, lässt es sich aus jungem Gewebe in der Kälte mit neutraler Kochsalzlösung (12) extrahieren. Ein weit grösserer, bereits in Form von Fibrillen enthaltener Anteil ist mit verdünnten Säuren oder schwach sauren Puffern (13) z.B. aus der Haut von Kälbern extrahierbar. Dieser Anteil wurde nach einem Vorschlag von Orechowitsch ursprünglich Prokollagen genannt. Inzwischen ist man übereingekommen, beide löslichen Kollagen-

vorstufen als Tropokollagen zu bezeichnen. Aus den erwähnten Extrakten scheiden sich - z.B. nach Dialyse gegen Wasser - Fibrillen ab (12, 13b), die eine normale Querstreifung zeigen, in den meisten chemischen und physikalischen Eigenschaften mit den Fibrillen des reifen Kollagens übereinstimmen, im Gegensatz zu diesen aber in verdünnter Essigsäure und in Citratpuffer vom pH 3,8 löslich sind. Auch durch Wasserstoffbrücken sprengende Reagenzien, wie Lithiumchlorid und Harnstoff, werden sie leicht in Lösung gebracht (14).

Die Struktur der reifen Kollagenfibrille ist im Tropokollagen also bereits angelegt, während Quervernetzungen, welche die Unlöslichkeit des reifen Kollagens bedingen, hier noch nicht ausgebildet sind.

Neben diesen natürlichen Vorstufen des Kollagens wurden künstliche Formen beobachtet, deren Entstehen durch die Arbeiten von Schmitt und Hodge (15), sowie von Kühn, Graßmann und Hofmann (16) in befriedigender Weise geklärt werden konnte. Es handelt sich um die sogenannten long-spacing Segmente (SLS) und um die long-spacing-Fibrillen (FLS). Erstere bilden sich in Form kurzer Faserstückchen nach Zusatz von ATP oder Nucleinsäuren zu Kollagenlösungen, während die long-spacing Fibrillen durch stark saure Polysaccharide wie Heparin, Chondroitinsulfat oder Hyaluronsäure zur Abscheidung gebracht werden können. Beide Formen entstehen durch verschiedenartige Zusammenlagerung der Tropokollagenmoleküle. In den $2.800 \text{ \AA}$ langen Segmenten (SLS) orientieren sich die polaren Tropokollagenmoleküle parallel, mit den Enden abschneidend, nebeneinander.

In den long-spacing Fibrillen (FLS) mit einer Periode von $2.800 \text{ \AA}$ und einem symmetrischen, vom normalen Kollagen grundsätzlich verschiedenen Querstreifungsmuster, sind die Tropokollagenmoleküle dagegen antiparallel angeordnet. Die normale Kollagenfaser mit einer Querstreifungsperiode von $650 \text{ \AA}$ entsteht aus Tropokollagenmolekülen, die jeweils um ein Viertel ihrer Länge gegeneinander versetzt zusammengelagert sind. Der experimentelle Nachweis zu dieser zuerst von Schmitt, Gross und Highberger (17) vorgeschlagenen Deutung wurde von Kühn (16b) durch photometrische Analyse des Querstreifungsmusters von SLS erbracht.

II. Quervernetzung und funktionelle Gruppen des Kollagens

Die Frage, welche chemischen Veränderungen den Übergang von löslichem Tropokollagen zum unlöslichen, reifen Kollagen begleiten, ist seit langem zu einem der wichtigsten Probleme der Kollagenforschung geworden.

Physikalisch-chemische Untersuchungen des gummielastischen Verhaltens von denaturiertem Kollagen (18), zeigten, dass es sich bei reifem Kollagen um ein linearpolymeres Gebilde handeln muss, dessen Tropokollagenbausteine in weiten Abständen durch Quervernetzungen verbunden sind. Die grosse Resistenz dieser Vernetzungen gegen Wasserstoffbrücken sprengende Agentien (19), wie konz. Lösungen von Harnstoff, LiCl und NaClO_4 sowie gegen Hitze, lässt darauf schliessen, dass es sich hierbei um Hauptvalenzkräfte handelt.

Während Tropokollagenfibrillen beim Erwärmen auf 61°C in gelatinöser Form in Lösung gehen, schrumpft reifes Kollagen etwa bei der gleichen Temperatur lediglich zu einer Masse von kautschukartiger Konsistenz zusammen ohne sich aufzulösen. Wasserstoffbrückensprenger lösen Tropokollagen unter Denaturierung auf; Kollagen wird dagegen nicht aufgelöst (19, 20).

Diese Tatsachen lassen sich nur dann verstehen wenn man annimmt, dass im Kollagen Quervernetzungen vorhanden sind, die im Tropokollagen fehlen.

Hydroxylaminempfindliche Bindungen (Esterbrücken)

Von Gustavson (21) wurde erstmals die Vermutung geäussert, dass es sich bei diesen hauptvalenzmässigen Vernetzungen um Esterbrücken handeln könnte, die durch Reaktion der Carboxylgruppen von Dicarbonsäuren mit den Hydroxylgruppen einer benachbarten Peptidkette zustandekommen.

Die Diskussion dieser Fragen ergab jedoch sehr bald, dass grundsätzlich zwischen zwei verschiedenen Arten von Quervernetzungen unterschieden

werden muss: Einerseits können sich innerhalb des Tropokollagenmoleküls zwischen den einzelnen Peptidketten der Dreierspiralen Querverbindungen ausbilden. Hierbei handelt es sich um eine intramolekulare Vernetzung. Andererseits ist auch eine intermolekulare Verbindung (19) zwischen verschiedenen Tropokollageneinheiten denkbar. Die erwähnten Löslichkeitsunterschiede zwischen Tropokollagen und Kollagen können nur durch das Vorhandensein von intermolekularen Quervernetzungen gedeutet werden. Dass auch intramolekulare Vernetzungen in löslichem Kollagen vorhanden sein müssen, folgt aus Arbeiten von Veis (22), von Doty und Nishihara (23) sowie Graßmann, Hannig und Engel (24). Die Autoren beobachteten, dass citratgelöstes Tropokollagen beim Denaturieren in zwei Fraktionen α und β zerfällt. Molekulargewichtsbestimmungen an der Ultrazentrifuge ergaben Werte von 115.000 für α und 215.000 für β . Die Deutung lag nahe, dass es sich bei der schwereren Fraktion (β) um zwei noch miteinander verknüpfte Peptidketten, bei der leichteren um eine Einzelkette handeln müsse. Schliesslich wurde eine dritte sogenannte γ -Komponente vom Molekulargewicht 300.000 ermittelt, die offensichtlich aus drei noch intramolekular miteinander vernetzten Polypeptidketten bestand.

Von Gallop (25) sowie von Hörmann und Klenk (19, 26) wurden die Quervernetzungen erstmals einer genaueren chemischen Analyse unterworfen. Hierbei konnte die Vermutung, dass es sich um Esterbrücken handeln könne, durch die Tatsache gestützt werden, dass sich gewisse Bindungen bei denaturiertem Kollagen und Tropokollagen durch Umsetzung mit Hydroxylamin in Hydroxamsäuren überführen lassen. Genaue Hydroxamsäurebestimmungen ergaben, dass Kollagen mehr hydroxylaminempfindliche Bindungen enthält als Tropokollagen, wobei sich nach Hörmann und Klenk die Differenz von 0,4 Mol/100 Mol Aminosäuren auf die intermolekularen Quervernetzungen des Kollagens zurückführen lässt.

Die hydroxylaminempfindlichen Bindungen des reifen Kollagens und des Tropokollagens, die in ihrem Verhalten Esterbindungen entsprechen, unterscheiden sich aber nicht nur in ihrer Anzahl, sondern auch in ihrer Reaktionsfähigkeit. So löst sich natives Tropokollagen

in 0,75 m NH_2OH bei pH 8,5 langsam auf, wobei sich Hydroxamsäuren bilden. Durch Dialyse gegen Wasser kann es wieder in Form von Fasern mit der charakteristischen Querstreifung des nativen Kollagens abgetrennt werden. In reifem, nativem Kollagen sind die Hydroxylaminempfindlichen Bindungen dagegen bei mässig alkalischer Reaktion (pH 9,5) nicht zugänglich. Sie reagieren nur dann unter Auflösung des Kollagens mit NH_2OH , wenn das Eiweiss zuvor durch Temperatureinwirkung oder durch gleichzeitigen Zusatz von LiCl denaturiert wurde.

Die Beteiligung von Hexosen an Quervernetzungen

Im Jahre 1935 wurde von Graßmann und Schleich (27) erstmals eine Kohlenhydratkomponente des Kollagens entdeckt. Später fand man (28, 10c), dass selbst Tropokollagen, welches durch wiederholtes Umkristallisieren hochgereinigt worden war, einen Gehalt von etwa 0,5 Gew.% Hexosen aufweist. Die gleiche Menge wurde im reifen Kollagen gefunden. Dieser Anteil ist fest mit dem Faserprotein verbunden und kann nicht wie die zu 0,2 - 0,5 % in Kollagen enthaltenen Hexosamine (29) ohne tiefgreifende chemische Veränderungen von ihm abgetrennt werden. Bei diesen Zuckern handelt es sich vor allem um Glucose und Galactose (19b, 27, 28) neben sehr kleinen Mengen Mannose (30) und Fucose (31).

Was nun die Art der Bindungen dieser Hexosen an das Kollagen betrifft, so konnte nachgewiesen werden, dass die Zucker ihre reduzierenden Eigenschaften verloren haben und nicht N-glycosidisch gebunden sein können, da sie sonst mit Phenylhydrazin Osazone bilden sollten, was jedoch nicht der Fall ist (32). Näheren Aufschluss über die Bedeutung der Hexosen in Kollagen ergab ihr Abbau durch Perjodat. Die Einwirkung von Perjodat auf Kollagen wurde erstmals von Bangle und Alford (33) sowie von Graßmann und Kühn (34) genauer untersucht. Hierbei ergab sich, dass Kollagen durch Na-Perjodat bei mässig erhöhter Temperatur (40°C , pH 8,0) innerhalb von wenigen Tagen gelöst wird. Da bekannt war, dass Perjodat eine oxydative, spezifische Spaltung von 1,2-Glykolgruppierungen bewirkt, ein Strukturelement, welches für Kohlenhydrate charakteristisch ist, schlossen die Autoren daraus, dass diese massgeblich am Aufbau

der Kollagenfaser beteiligt sein müssen.

Durch Untersuchungen von Hörmann und Fries (35) sowie von Klenk (19b) wurden diese Befunde weiter ausgebaut. Es hatte sich gezeigt, dass durch Einwirkung von Perjodat auf reifes Kollagen in essigsauerm Medium bei Zimmertemp. die Hexosen bis auf einen kleinen Rest zerstört werden. Darüberhinaus werden die Seitenketten des Hydroxyllysins, Tyrosins und Methionins in einer langsamen Reaktion oxydiert, was zu charakteristischen Veränderungen der Aminosäurezusammensetzung führt. Klenk war es schliesslich gelungen, durch gleichzeitige Einwirkung von Perjodat und von Wasserstoffbrücken sprengenden Agenzien (z.B. Harnstoff) auf Kollagen, dieses hochmolekular in Lösung zu bringen.

Vergleicht man die Menge an Hexosen mit dem Anteil an hydroxylaminempfindlichen Bindungen der für die intermolekularen Quervernetzungen verantwortlich ist, so stellt man fest, dass beide annähernd übereinstimmen (19b, 36).

Aus all diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass diese Quervernetzungen durch den Einbau von Kohlenhydraten in das Kollagen zustande kommen und zwar derart, dass die reduzierende Gruppe des Kohlenhydrats O-glycosidisch an die Dreierspirale eines Tropokollagenmoleküls gebunden ist, während eine oder gar mehrere der Hydroxylgruppen des Zuckers mit Carboxylgruppen einer zweiten Dreierspirale verestert sind. Auf diese Weise kommt es zur Ausbildung von bifunktionellen, möglicherweise trifunktionellen quervernetzenden Verknüpfungen (19a) der die Faser aufbauenden Tropokollageneinheiten. Diese Vorstellungen bedürfen jedoch noch einer weiteren Bestätigung. So ist vor allem noch ungewiss, welche der freien Hydroxyl- und Carboxylgruppen des Kollagens am Einbau der Hexosen beteiligt sind. Da auf 1.000 Mol Aminosäuren etwa 4 Mol Hexosen bzw. Quervernetzungen entfallen, sollten von jeder Dreierspirale, jeweils im Abstand einer Identitätsperiode von $640 \overset{\circ}{\text{Å}}$, zwei Vernetzungsvalenzen ausgehen.

Weitere Quervernetzungen über funktionelle Gruppen

Von verschiedenen Arbeitskreisen werden seit längerer Zeit eine Reihe

weiterer Arten von Quervernetzungen diskutiert, die möglicherweise im Kollagen verwirklicht sein könnten. Von Gustavson (21) wurde zuerst auf die Möglichkeit hingewiesen, dass seitenständige Carboxylgruppen einer Peptidkette mit den Hydroxylgruppen des Hydroxyprolins, Serins oder Threonins einer zweiten Kette verestert sind. Dies würde erklären, weshalb ein Teil dieser Hydroxylgruppen einer Acetylierung nicht zugänglich ist (37). Untersuchungen an Gelatine führten Gustavson (21a) zu der Annahme, dass die Guanidogruppen des Arginins, die ebenfalls zum Teil in maskierter Form vorliegen, über seitenständige Carboxylgruppen der Nachbarkette covalent gebunden seien.

Hierbei handelt es sich um Hypothesen, die noch des exakten experimentellen Nachweises bedürfen.

Eine weitere Möglichkeit zur Ausbildung von Quervernetzungen zwischen den Tropokollagenmolekülen besteht in der amidartigen Verknüpfung der seitenständigen Carboxylgruppen mit ϵ -Aminogruppen von Lysinresten. Verschiedene Befunde (38, 39, 40), nach denen die ϵ -Aminogruppen des Kollagens nur unvollkommen substituiert werden können (vergl. dazu S. 33f), scheinen diese Vorstellungen zu stützen.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, zur Klärung dieser Fragen beizutragen.

Kollagen und Proteasen

Enzymatische Untersuchungen ergaben, dass Kollagen in nativer Form nur durch das Enzym Kollagenase abgebaut wird. Von Proteasen wie Pepsin und Trypsin wird Kollagen nur im denaturierten Zustand verdaut. Gewisse Veränderungen vermag Pepsin jedoch auch am nativen Kollagen hervorzurufen.

Nach Arbeiten von Nishihara (41), sowie von Kühn und Hörmann (42) kann reifes Kollagen durch Einwirkung von Pepsin bei 25° C in stark verdünnter Säure vollständig in Form nativer Teilchen in Lösung gebracht werden. Aus diesen Lösungen lassen sich wieder Fibrillen des nativen Typs mit elektronenmikroskopischer Querstreifung und long-spacing Segmente (SLS) ausfällen.

Von Hörmann und Hafter (43) durchgeführte Viskositätsmessungen

an Lösungen, die durch Einwirkung höherer Enzymkonzentrationen (Kollagen: Pepsin = 40: 1) auf säureunlösliches Kälberkollagen hergestellt worden waren, ergaben eine merkliche Abnahme der Viskositätszahl, die einer vollständigen Aufspaltung des zu Aggregaten von Polymeren zusammengeschlossenen Kollagens in einzelne monomere Tropokollagenmoleküle entsprechen könnte. Diese Ergebnisse wurden durch Arbeiten von F. O. Schmitt et al. (44) bestätigt.

Dass aber auch das Kollagenmonomere selbst durch die Einwirkung von Pepsin in charakteristischer Weise verändert wird, ergab sich aus Untersuchungen von F. O. Schmitt, Kühn und Nishihara. So konnte Kühn (45) die bereits von F. O. Schmitt (44) gemachte Beobachtung bestätigen, dass ein gleichzeitiger Angriff des Pepsins auf die intramolekularen Bindungen des Kollagens erfolgt. Sedimentationsversuche ergaben, dass eine 40-stündige Einwirkung sehr hoher Pepsinkonzentrationen (Kollagen: Pepsin = 2 : 1) auf Sehnenkollagen bei pH 2,0 u. 25° C, die β -Komponente völlig zum Verschwinden bringt, so dass nur noch reines, unvernetztes α -Tropokollagen vorliegt. Dies bedeutet, dass durch das Enzym nicht allein die intermolekularen Bindungen zwischen den einzelnen Tropokollagenmonomeren gespalten werden, was zu einer völligen Auflösung des Materials führt, sondern dass darüberhinaus auch die intramolekularen Bindungen, welche die drei Peptidketten innerhalb der Tropokollagenmolekel miteinander vernetzen, durch Pepsin geöffnet werden.

Neben dieser Spaltung intramolekularer Quervernetzungen konnten F. O. Schmitt (44) und Nishihara (41) als weiteren Effekt eine durch das Enzym bewirkte Abspaltung endständiger Peptidsequenzen, sogenannter Telopeptide, vom Rumpf des Kollagenmonomeren beobachten. Die Aminosäure-Zusammensetzung dieser Peptide unterscheidet sich grundlegend von der des eigentlichen Tropokollagenmoleküls. Auffallend ist vor allem der hohe Gehalt an Tyrosin und ein nahezu völliges Fehlen des für das Kollagen so charakteristischen Hydroxyprolins.

Endgruppen im Kollagen

Seit Einführung der eleganten Dinitrofluorbenzol-Methode zum Nachweis von Aminoendgruppen durch Sanger (46), konnte in einer ganzen Reihe kompliziert gebauter, hochmolekularer Proteine, wie Hämoglobin, Myoglobin, Edestin, Serumalbumin und vielen anderen, die N-terminalen Aminosäuren exakt bestimmt werden (47).

Ausgehend von der beschriebenen Struktur des Tropokollagenmoleküls, welches ein Molekulargewicht von 360.000 besitzt und aus drei vernetzten Polypeptidspiralen aufgebaut ist, kommt man zu dem Ergebnis, dass jedes der drei Kettenenden jeweils eine Aminoendgruppe tragen sollte, oder dass- anders ausgedrückt - auf etwa 1.000 Mol Aminosäuren 1 Mol Endgruppen entfallen sollten.

Bei Anwendung der Sangerschen Methode auf das Kollagen durch Graßmann und Hörmann (48), Bowes und Moss (38), sowie Joseph und Bose (49), konnten die Autoren jedoch keine Aminoendgruppen nachweisen. Nur sehr kleine Mengen der verschiedensten Aminosäuren, vor allem Asp, Gly, Glu, Ser, Ala, wurden in Form ihrer DNP-Derivate identifiziert. Von den meisten dieser Aminosäuren ist bekannt, dass Peptidbindungen, an denen sie mit ihrer Aminogruppe beteiligt sind, leichter hydrolytisch gespalten werden als andere (50). Es ist daher verständlich, dass bei Endgruppenbestimmungen an Gelatine, d.h. an alkali-behandeltem, verkochtem Kollagen, vor allem diese an labilen Bindungen beteiligten Aminosäuren in mehr oder weniger grossen Mengen auftreten (36, 51), wobei gleichzeitig als Folge der Spaltung von Peptidbindungen, eine starke Abnahme des Molekulargewichtes zu beobachten ist.

Soweit bisher am Kollagen Bestimmungen der Aminosäuren der Carboxylenden durchgeführt wurden, stimmen sie mit den Untersuchungen über die Aminoendgruppen überein. Auch hier konnten nur Spuren von Aminosäuren nachgewiesen werden (48). Allerdings gibt es für den Nachweis carboxylendständiger Aminosäuren noch keine, der Sanger'schen an Einfachheit und Sicherheit vergleichbare Methode.

Kollagen ist aber nicht das einzige Beispiel eines hochmolekularen Eiweisskörpers ohne nachweisbare Aminoendgruppen. Auch Untersuchungen

an Ovalbumin (52) und Myosin (53) führten zu negativen Ergebnissen. Die Deutung dieser Befunde erscheint schwierig. Seitdem jedoch bekannt wurde, dass die Aminoendgruppe des Cytochroms C aus Pferdeherz (54), der Proteinkomponente des Tabakmosaikvirus (55) und wahrscheinlich auch die des Ovalbumins (52) und anderer Proteine acetyliert ist, muss diese, sowie eine Reihe anderer Möglichkeiten (wie endständige Pyrrolidoncarbonsäure, nachgewiesen an Fibrinogen B (104) N-Phosphorylierung und Blockierung durch Mucopolysaccharide) auch für das Kollagen diskutiert werden. Im Jahre 1958 erschien eine Arbeit von Deasy (56), in welcher über den Nachweis äquivalenter Mengen an Asp, Gly und Ser als echte α -Aminoendgruppen des Kollagens berichtet wird. Genaue Angaben über die Mengen der als DNP-Derivate isolierten Aminosäuren fehlen.

Grundsätzliche Erwägungen und diese sich zum Teil widersprechenden oder unklaren Befunde, gaben den Anlass, die Frage der Aminoendgruppen des Kollagens im Verlaufe dieser Arbeit erneut zu überprüfen.

III. Aufgabenstellung

Das Grundgerüst der vorliegenden Arbeit bilden Untersuchungen über verschiedene Substitutionsreaktionen an den Aminogruppen des Kollagens und zwar sowohl an den Aminofunktionen in den Seitenketten der Lysinreste als auch an den α -Aminoenden. Durch Einführung geeigneter Substituenten in die ϵ -Aminogruppen sollten Derivate des Kollagens geschaffen werden, die für elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Lokalisierung der Lysinreste im Tropokollagen brauchbar erscheinen. Quantitative Versuche sollten weiterhin die Zugänglichkeit der ϵ - und α -Aminogruppen für Substitutionsreaktionen klären. Es war festzustellen, ob und wieviele dieser Gruppen im Kollagen frei und wieviele geschützt vorliegen. Die vor allem bei der Untersuchung der Aminoenden erarbeiteten quantitativen Bestimmungsmethoden sollten darüber hinaus dazu eingesetzt werden festzustellen, wie weit verschiedene spezifische Abbaureaktionen des Kollagens mit Schädigungen der Peptidkette verbunden sind. In einem Falle (Punkt 4c) sollten die dabei gewonnenen Ergebnisse auch zu einer Weiterentwicklung und Verbesserung der Abbaumethoden führen. Im einzelnen waren folgende Probleme zu bearbeiten:

1.) Die ϵ -Aminogruppen des Kollagens sollten mit sulfhydrylhaltigen Substituenten besetzt werden. Die auf diese Weise eingeführten SH-Funktionen sollten mit Schwermetallen beladen, eine Lokalisierung der ϵ -Aminogruppen im Elektronenmikroskop ermöglichen. Acylierungsmethoden und Reaktionsbedingungen waren zuvor eingehend an Modellsubstanzen zu studieren.

2.) Die Beteiligung von ϵ -Aminogruppen an der Quervernetzung war durch Überprüfung der Substituierbarkeit freier ϵ -Aminogruppen der basischen Seitenketten des Kollagens zu untersuchen.

3.) Die Aminogruppen von nativem und denaturiertem Tropokollagen und Kollagen sollten nach der DNP-Methode quantitativ und qualitativ bestimmt werden. Da Endgruppen wegen des grossen Molekulargewichtes der Peptidketten des Kollagens (100 - 120.000) nur in sehr geringer Menge zu erwarten waren, war die Methode auf eine entsprechende

Empfindlichkeit zu verfeinern. Das umfasste sowohl eine Untersuchung der Hydrolysebedingungen als auch eine methodische Weiterentwicklung der chromatographischen Auftrennung der erhaltenen DNP-Aminosäuren.

4.) Die verfeinerte Methode der Amino-Endgruppenbestimmung sollte dazu herangezogen werden, die Spaltung von Peptidketten bei der Einwirkung verschiedener Reagenzien zu kontrollieren, die eine Spaltung der Quervernetzungen des Kollagens zur Folge haben.

Dabei handelt es sich

- a) um die Einwirkung von Pepsin auf natives Kollagen, die mit einer Spaltung von Quervernetzungen und nach Vorstellung von F.O.Schmitt auch mit einer Abspaltung endständiger Peptidsequenzen verbunden ist;
- b) um die Einwirkung von Perjodat, welches die Kohlenhydratvernetzungen und einige wenige empfindliche Aminosäuren des Kollagens in den Seitenketten zerstört, sowie
- c) um die Einwirkung von Hydroxylamin, das esterartige Bindungen in den Quervernetzungen des Kollagens angreift. Die Reaktion mit Hydroxylamin sollte auf Grund der Ergebnisse der Endgruppenbestimmung und mit der weiteren Hilfe der hierbei angewandten Methode verbessert und durch Einsatz von Ultrazentrifuge und Elektronenmikroskop ausgebaut werden. Ausserdem war im Anschluss an Ergebnisse von Gallop et al. (57) zu prüfen, ob die seitenständigen Carboxylgruppen der Asparagin- und Glutaminsäure an Reaktionen mit Hydroxylamin beteiligt sind. Durch Lossen'schen Abbau sollte versucht werden, die seitenständigen Hydroxamsäurereste in Aminogruppen überzuführen.

B. Ergebnisse

I. Versuche zur elektronenmikroskopischen Lokalisierung der ϵ -Aminogruppen im Kollagen

Für eine elektronenmikroskopische oder röntgenographische Lokalisierung der ϵ -Aminogruppen des Kollagens erschien es notwendig, dieselben mit Substituenten zu besetzen, die durch Schwermetalle hohen Molekulargewichtes (Ag, Pb) beladen werden können. Als geeigneter Weg zur Verwirklichung dieses Zieles erschien die Acylierung der Aminogruppen mit SH-haltigen Substituenten und die anschliessende Umsetzung der Sulfhydrylgruppen mit Schwermetallsalzen.

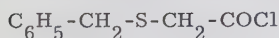
1. Acylierungsmittel

Bei den verwendeten Acylierungsmitteln handelt es sich durchweg um Derivate der Thioglykolsäure. Die Einführung des Thioglykolsäurerestes wurde über drei verschiedene Wege versucht:

1. Über ein SH-geschütztes Derivat, nämlich S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid. Die S-Benzylgruppe kann durch Natrium in flüssigem Ammoniak abgespalten werden.
2. Über das bifunktionelle Säurechlorid der Dithiodiglykolsäure und anschliessende Reduktion der Disulfidbindung.
3. Über das cyclische Anhydrid der Dithiodiglykolsäure und anschliessende Reduktion.

Die genannten Acylierungsmittel waren auf folgenden Wegen zugänglich:

a) S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid:



S-Benzyl-Thioglykolsäure wurde nach Andreasch (58), durch Benzylierung von Na-Thioglykolat in wässriger Natronlauge dargestellt. Die Ausbeute betrug 98,7%.

Die Umsetzung zum Säurechlorid erfolgte nach Lesser und Mehrländer

(59) durch Reaktion mit Thionylchlorid. Nach Abdestillieren des überschüssigen Thionylchlorids wurde das entstandene S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid fraktioniert. Die Ausbeute betrug 84,0 % der Theorie.

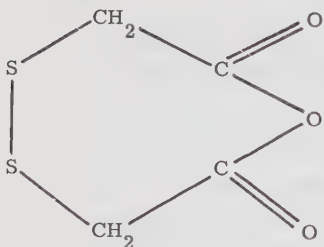
Im Interesse einer besseren Ausbeute wurden die Darstellungsmethoden geringfügig modifiziert (s. experimenteller Teil zu Kapitel I).

b) Dithiodiglykolsäure-Dichlorid:



Die Darstellung des Dichlorids der Dithiodiglykolsäure geschah nach der Vorschrift von Gulland, Partridge und Randall (60) durch Umsetzung von Dithiodiglykolsäure mit Phosphorpentachlorid in abs. Äther bei -10°C . Die Ausbeute betrug 64,0%.

c) Cyclisches Dithiodiglykolsäure-Anhydrid:



Die Darstellung des bisher in der Literatur nicht beschriebenen Anhydrids der Dithiodiglykolsäure gelang durch Umsetzung der Säure mit Acetylchlorid am Rückfluss. Die entstehende Salzsäure entweicht zum Teil aus dem Reaktionsgemisch, die gleichzeitig gebildete Essigsäure muss gemeinsam mit dem überschüssigen Acetylchlorid anschliessend

am Vakuum abdestilliert werden. Das zurückbleibende Dithiodiglykolsäure-Anhydrid wird aus abs. Essigester-Äther umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 68,1 % der Theorie. Ein Versuch, das Anhydrid nach der üblichen Methode durch Umsetzung der Säure mit Essigsäureanhydrid darzustellen misslang, da auf Grund des wesentlich höheren Siedepunktes des Essigsäure-Anhydrids ($139,4^\circ \text{C}$) beim Abdestillieren der letzten Reste unter vermindertem Druck völlige Zersetzung des sehr temperaturempfindlichen Produktes eintrat.

Die Konstitution der Verbindung, ein 7-Ring mit Disulfid-Brücke konnte durch die Ergebnisse der Elementaranalyse bestätigt werden. Eine Molekulargewichtsbestimmung nach Rast war nicht durchführbar, da sich das Anhydrid

beim Erhitzen mit Campher zersetzt. Das Anhydrid hydrolysiert rasch beim Stehen an der Luft. Die entstehende Dithiodiglykolsäure wurde durch Schmelzpunkt charakterisiert. Im Gegensatz zur Säure ist das Anhydrid in Äther unlöslich, ebenso in Benzol und Alkohol, dagegen wird es von warmem Aceton rasch gelöst.

2. Reaktionen an den Modellsubstanzen

Die Substitution von Aminogruppen durch die beschriebenen Acylierungsmittel wurde zunächst an Modellsubstanzen studiert. Diese Arbeitsweise hatte sich vor allem bei den Versuchen mit den beiden disulfidhaltigen Reagenzien als notwendig erwiesen, nachdem dieselben sehr leicht Verharzungsreaktionen unterliegen. Durch die Reaktionen an Modellsubstanzen galt es, die mildesten Bedingungen für eine möglichst quantitative Umsetzung von Aminogruppen mit den genannten Reagenzien zu ermitteln. Erst nach erfolgreichem Abschluss der Modellversuche sollten die Reaktionen am Kollagen selbst ausgeführt werden.

Als Modellsubstanzen wurden n-Butylamin und α -N-Benzoyl-DL-Lysin gewählt, die beide den Vorzug haben, im pK-Wert - dieser für alle an der NH_2 -Gruppe angreifenden Reaktionen wichtigen Grösse - mit dem für die ϵ -Aminogruppe des Kollagens ermittelten Wert übereinzustimmen. (Gustavson) (61):

n-Butylamin,	pK: 10,6
Lysin (ϵ -Amino),	pK: 10,5
Kollagen (ϵ -Amino),	pK: 11,0

a) n-Butylamin als Modellsubstanz

α) Umsetzung von n-Butylamin mit S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid zu S-Benzyl-Thioglykolsäure-n-Butylamid

Bei der Darstellung dieses bisher nicht beschriebenen Säureamids führt die Reaktion unter Anwendung der doppelten stöchiometrischen Menge an Säurechlorid unter Einsatz von Pyridin als HCl-bindender Base zu einer Ausbeute von 93,8 %. Das gebildete Säureamid, ein gelbliches Öl, konnte nach Vakuumdestillation analysenrein erhalten werden.

Um die günstigsten Bedingungen für eine quantitative Umsetzung des

S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorids mit Kollagen zu studieren, wurde die pH-Abhängigkeit der Reaktion zwischen n-Butylamin und S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid genau untersucht.

Die Umsetzung mit Kollagen sollte nämlich bei möglichst niedrigem pH-Wert erfolgen, um eine Quellung zu vermeiden, die möglicherweise nicht mehr rückgängig gemacht werden kann und die bei der anschliessenden elektronenmikroskopischen Untersuchung Anlass zu unscharfen Abbildungen gibt. Bei den Untersuchungen wurde unter Verwendung von Phosphat- und Boratpuffern an Stelle von Pyridin, die Ausbeute an Säureamid innerhalb des pH-Bereiches von 5,4 - 10,6 gravimetrisch bestimmt.

Die in Tab. 1 zusammengefassten Ergebnisse dieser pH-Abhängigkeitsversuche wurden in Abb. 1 in Form eines Diagrammes graphisch aufgetragen. Man erhält zwei Kurven, die in ihrem Verlauf an Titrationskurven erinnern.

Tab. 1

pH-Abhängigkeit der Reaktion zwischen S-Benzyl-Thioglykolsäure-Chlorid und n-Butylamin:

Puffer:	pH	Ausbeute	pH-Abfall ⁺⁾	pH-Anstieg (bei Amin- zusatz)
Phosphat- puffer (1 molar)	5,40	31,8 %	2,39	0,78
	6,00	37,1 %	2,69	0,32
	7,00	86,0 %	1,38	0,18
	7,40	89,4 %	1,27	0,60
	8,00	92,8 %	3,73	2,23
Borat- puffer (1 molar)	8,11	79,5 %	4,45	0,89
	9,00	86,0 %	2,00	0,38
	10,00	97,5 %	1,15	0,16
	10,63	98,45 %	0,93	0,14

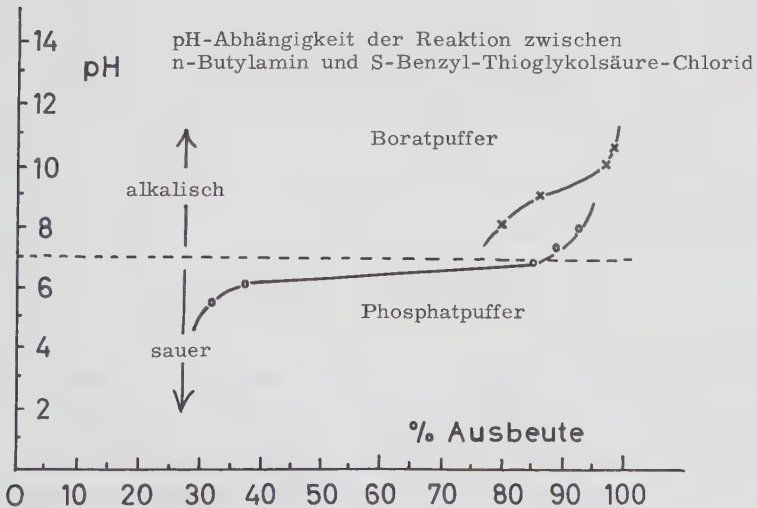
+) Unter pH-Abfall wird das Absinken des pH-Wertes nach erfolgter Zugabe des Säurechlorids verstanden. Diese Werte, ebenso wie die pH-Differenzen nach erfolgtem Aminzusatz, sind ein direktes Mass für die Pufferkapazität, die nach den Randgebieten hin nachlässt.

Die Ergebnisse zeigen, dass selbst eine bei pH 7,0 durchgeführte Reaktion auf Grund der sehr raschen Einstellung des Gleichgewichtes:



Unterhalb pH 7,0 fallen die Ausbeuten dagegen rasch ab. Eine Umsetzung von Kollagen mit S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid im schwach alkalischen Bereich erscheint demnach durchaus möglich.

Abb. 1



β) Umsetzung von n-Butylamin mit Dithiodiglykolsäure-Dichlorid und Reduktion der Disulfidbrücke

Die Umsetzung von n-Butylamin mit Dithiodiglykolsäure-Dichlorid in abs. Äther führte bei einer Ausbeute von 48,3 % zum Dithiodiglykolsäure-di-n-Butylamid. Bei der Umsetzung wurde ein Überschuss an Butylamin einge-

setzt, um die gleichzeitig entstehende Salzsäure zu binden. Durch Umkristallisieren aus Essigester-Petroläther wurde ein kristallines, analysenreines Produkt erhalten.

Die nur etwa 50%-ige Ausbeute ist wohl darauf zurückzuführen, dass ein Teil des hydrolyseempfindlichen Säurechlorids monofunktionell statt bifunktionell wie erwartet, mit dem Amin reagiert hat. Das Studium der Reaktion ergab, dass eine Umsetzung unter Zusatz eines tertiärenamins (Pyridin, Chinolin, Triäthylamin) zur Bindung der entstehenden HCl nicht durchführbar ist, da - wie zahlreiche Versuche zeigten - das Dithiodiglykolsäure-Dichlorid in Gegenwart tertiärer Amine verharzt. Aus den teerigen Produkten liess sich keine definierte Verbindung isolieren. Das in wässrigem Äthanol gelöste Dithiodiglykolsäure-di-n-Butylamid wurde nach Goddard und Michaelis (62) mit Na-Thioglykolat bei pH 9,0 reduziert. Das nach Ansäuern und Extrahieren mit Essigester in Form eines Öles mit einer Ausbeute von 98,8 % anfallende, an der Luft rasch oxydierende Thioglykolsäure-n-Butylamid wurde mit Hopkins-Reagenzlösung als Hg-Salz ausgefällt. Das Salz liess sich nur aus heisser halbkonz. HCl umkristallisieren. Hierbei war aus dem zunächst in der Form:



vorliegenden Hg-Salz unter Einwirkung der Salzsäure eine Verbindung entstanden, welcher folgende Formel zukommt:



Dabei wurden 50 % des organischen Thioglykolsäure-n-Butylamid-Restes als freie Sulfhydrylverbindung abgespalten und durch Chlorid ersetzt. Die Formel (2) wurde durch Analyse bestätigt. Das Produkt ist jedoch möglicherweise dimer. Eine Molekulargewichtsbestimmung nach Rast war nicht möglich, da die Substanz in Campher unlöslich ist. Aus dem Hg-Salz wurde durch Behandeln mit H_2S das Thioglykolsäure-n-Butylamid in Form eines Öles wieder in Freiheit gesetzt. Nach erfolgter Luftoxydation bestätigte der Mischschmelzpunkt, dass das Produkt mit der Ausgangssubstanz Dithiodiglykolsäure-di-n-Butylamid identisch war. Die auf diese Weise erfolgte Rückführung des Produktes in die Ausgangsverbindung bewies die gute Verwendungsmöglichkeit von Na-Thioglykolat

bei der reduktiven Spaltung von Disulfidbrücken. Eine Übertragung der Reaktion auf entsprechend acylierte Kollagenpräparate sollte demnach durchaus möglich sein.

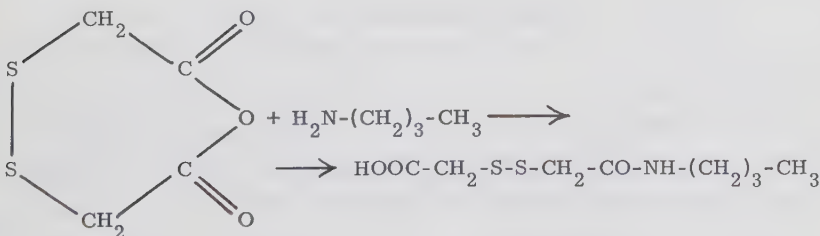
γ) Umsetzung von cyclischem Dithiodiglykolsäure-Anhydrid mit n-Butylamin

Der Versuch einer Darstellung von Dithiodiglykolsäure-mono-n-Butylamid durch Umsetzung von Dithiodiglykolsäure-Anhydrid mit n-Butylamin in abs. Aceton führte nicht zu dem erwarteten asymmetrischen Mono-substitutionsprodukt, sondern zu der symmetrischen Verbindung Dithiodiglykolsäure-di-n-Butylamid und Dithiodiglykolsäure. Das mit einer Ausbeute von 34,5 % isolierte Di-n-Butylamid wurde durch Mischschmelzpunkt mit dem unter β) hergestellten Produkt, Analyse und Molekulargewichtsbestimmung nach Rast identifiziert. Die gleichzeitig entstandene Dithiodiglykolsäure wurde ebenfalls isoliert, doch muss angenommen werden, dass diese zum Teil durch Hydrolyse des Anhydrids gebildet wurde.

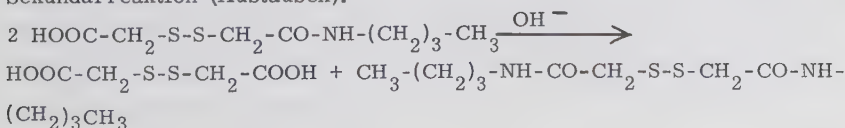
Die Entstehung des symmetrischen Endproduktes wird durch einen in ähnlichen Fällen häufig zu beobachtenden alkalikatalysierten Disulfidaustausch gut erklärt.

Der Reaktionsverlauf stellt sich demnach wie folgt dar:

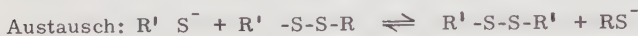
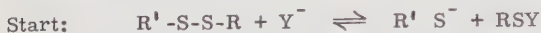
Primärreaktion:



Sekundärreaktion (Austausch):



Der Mechanismus des über das Merkaptid-Ion RS^- führenden, alkalikatalysierten Disulfidaustausches wurde von R.E.Benesch u. R. Benesch (63), sowie von Parker u. Kharasch (64) eingehend studiert und beschrieben. Er verläuft über folgende zwei Stufen:



b) α -N-Benzoyl-DL-Lysin als Modells substanz

α) Darstellung:

Um α -substituierte Derivate von DL-Lysin als Modells substanz einsetzen zu können, musste zunächst die α -Aminogruppe durch einen schwer abspaltbaren Rest blockiert werden.

Durch Umsetzung des DL-Lysin-Kupferkomplexes mit Carbobenzoychlorid nach der Vorschrift von Neuberger u. Sanger (65) wurde in einem ersten Schritt die ϵ -Aminogruppe durch die leicht wieder abspaltbare Carbobenzoygruppe maskiert.

In einem zweiten Schritt wurde die α -Aminogruppe des analysenrein erhaltenen ϵ -N-Carbobenzoy-DL-Lysins durch Umsetzung mit Benzoylchlorid acyliert und damit als Aminfunktion ausgeschaltet. Da sich in der Literatur keine Vorschrift zur Benzoylierung dieses Produktes fand, musste die Umsetzung selbst ausgearbeitet werden. Das erhaltene Produkt war analysenrein.

Von dem auf diese Weise in 76,6%-iger Ausbeute dargestellten ϵ -N-Carbobenzoy, α -N-Benzoyl-DL-Lysin wurde in einem dritten Schritt die Carbobenzoy-Schutzgruppe durch katalytische Hydrierung nach Bergmann (66) wieder abgespalten.

Das auf diesem Wege mit 94,8%-iger Ausbeute erhaltene chromatographisch und analytisch reine α -N-Benzoyl-DL-Lysin mit der freien ϵ -Aminogruppe konnte nun als Modells substanz Verwendung finden.

β) Umsetzung von α -N-Benzoyl-DL-Lysin mit S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid zu α -N-Benzoyl- ϵ -N, (S-Benzyl)-Thioglykoyl-DL-Lysin

Die Umsetzung in Dioxan-Wasser unter Zusatz von verd. Natronlauge

führte mit einer Ausbeute von 58,4 % zu dem kristallinen, analysenreinen Produkt α -N-Benzoyl- ϵ -N, (S-Benzyl)-Thioglykoyl-DL-Lysin. Auf eine Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe durch metallisches Natrium in flüssigem Ammoniak nach Du Vigneaud (67) wurde in diesem Falle - ebenso wie bei der analogen unter 2. a) α) beschriebenen Butylamin-Verbindung S-Benzyl-Thioglykolsäure-n-Butylamid - verzichtet, nachdem sich gezeigt hatte, dass diese Reaktion am Kollagen nicht durchführbar ist.

γ) Versuche, das α -N-Benzoyl-DL-Lysin mit Dithiodiglykolsäure-Dichlorid und dem Anhydrid der Dithiodiglykolsäure umzusetzen, scheiterten an der Tatsache, dass auf Grund des zwitterionischen Charakters des Lysin-Derivats in wässriger Lösung gearbeitet werden muss. Hierbei ist die Anwendung dieser beiden äusserst hydrolyseempfindlichen Acylierungsmittel jedoch nicht möglich. Der Versuch, diese Schwierigkeit durch Anwendung des in organischen Lösungsmitteln löslichen α -N-Benzoyl-DL-Lysin-Methylesters zu umgehen, erwies sich gleichfalls als nicht durchführbar, da sowohl das Dichlorid der Dithiodiglykolsäure wie unter 2. a) β) beschrieben, als auch deren Anhydrid mit tertiären Aminen, auf deren Zusatz zur Bindung der entstehenden Salzsäure nicht verzichtet werden kann, reagieren. Diese bei den Vorversuchen aufgetretenen Schwierigkeiten machten für die Umsetzung der ϵ -Aminogruppen des Kollagens mit den genannten disulfidhaltigen Acylierungsmitteln eine besondere Arbeitsweise notwendig, die an der betreffenden Stelle unter 3. b) und c) beschrieben ist.

3. Reaktionen am Kollagen

Bei den Versuchen, den Thioglykolsäurerest durch die drei Acylierungsmittel S-Benzyl-Thioglykolsäure, Dithiodiglykolsäure-Dichlorid und Dithiodiglykolsäure-Anhydrid in das Kollagen einzuführen galt es, durch Analyse der erhaltenen Produkte festzustellen, ob die Substitution der ϵ -Aminogruppen tatsächlich gelungen war. Zu diesem Zweck wurde der Gehalt an neu eingeführtem Schwefel nach der Mikromethode von Johnson und Nishita (68) bestimmt.

Zunächst war jedoch die im Ausgangsmaterial bereits enthaltene Menge an Schwefel zu ermitteln. Gleiches gilt für den Gehalt an basischen Aminosäuren soweit sie der Acylierung zugänglich sind.

Die analytischen Daten des bei den Umsetzungen verwendeten Sehnenkollagens sind in Tab. 2 zusammengefasst. Die Werte für die basischen Aminosäuren wurden einer quantitativen Aminosäure-Analyse (69) entnommen, während der Gehalt an Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt wurde.

Der ermittelte Gehalt an Gesamt-S von 0,32% stimmt gut mit den von Gustavson (70) und Zahn (71) angegebenen Werten überein. Wie aus der Tab. 2 hervorgeht, enthält 1 g Kollagen demnach 0,38 mMol acylierbare ϵ -Aminogruppen (einschliesslich der NH-Gruppe des Histidin-Imidazolrings).

Tab. 2

Analytische Daten des verwendeten Sehnenkollagens

Gehalt an:	Mol %	Gew. %	mMol/g Kollagen
N	-	17,0	-
Gesamt-Schwefel	-	0,32 ⁺⁾	0,09
anorg.Schwefel	-	0,04	0,01
Methionin-Schwefel	-	0,11	0,03
Methionin	0,36	0,46	0,035
Lysin	2,24	3,67	0,223
Hydroxylysin	0,93	1,33	0,092
Histidin	0,65	1,11	0,064

⁺⁾ Methionin ist die einzige im Sehnenkollagen vorkommende Aminosäure, die Schwefel enthält. Der ermittelte gesamte S-Gehalt des Kollagens von 0,32 % wird aber durch den Methionin-S-Gehalt von 0,11 % bei weitem

nicht gedeckt. Die Differenz wird auf im Sehnenkollagen enthaltenes Chondroitinsulfat zurückgeführt (H. Zahn) (71). Eine Bestimmung des anorganischen Schwefels ergab einen Gehalt von 0,04%.

a) Umsetzung von Sehnenkollagen mit S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid

In Pyridin suspendiertes Sehnenkollagen wurde 24 Stunden lang mit einem grossen Überschuss an S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid behandelt. Wegen der Unlöslichkeit des Säurechlorids in wässrigem Milieu wurde die Umsetzung mit Kollagen - analog der unter 2. a) α) beschriebenen Umsetzung mit der Modellsubstanz n-Butylamin - in Pyridin statt in alkalischer Pufferlösung ausgeführt. Dies war schon deshalb erforderlich, weil es sich hierbei um ein heterogenes System handelt, in welchem das Kollagen in fester Form vorliegt.

Das gründlich ausgewaschene Produkt wurde zur Entfernung der letzten Reste an S-haltigen Verunreinigungen durch Suspendieren in verd. NaHCO_3 -Lösung, verd. Essigsäure sowie organischen Lösungsmitteln bei Zimmertemperatur extrahiert.

Die Schwefelanalyse ergab, dass 1,08% S neu eingeführt worden waren. Dies entspricht ziemlich genau einer quantitativen Substitution aller ϵ -Aminogruppen des Lysins und Hydroxylamins (s. Tab. 3). Der Schrumpfungspunkt des Produktes war von 66°C (unbehandeltes Sehnenkollagen) auf 60°C gefallen.

Bei dem Versuch, den Benzylrest von dem mit S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid acylierten Kollagenpräparat durch Reduktion mit metallischem Natrium in flüssigem Ammoniak nach der Methode von Du Vigneaud (67) abzuspalten, um auf diese Weise zur freien Sulfhydrylgruppe zu gelangen, zeigte es sich, dass das Kollagen diesen Bedingungen nicht standzuhalten vermag. Das Protein ging hierbei unter völliger Zerstörung der Faserstruktur in Lösung. Damit hatte sich der Weg über die Benzylschutzgruppe als nicht gangbar erwiesen. Die Einführung des Thioglykolsäurerestes musste nun über das Dithiodiglykolsäure-Dichlorid bzw. -Anhydrid versucht werden.

b) Umsetzung von Sehnenkollagen mit Dithiodiglykolsäure-Dichlorid

Versuche an den Modellsubstanzen hatten ergeben, dass ein Zusatz von

tertiären Aminen wie Triäthylamin oder Pyridin als HCl-bindendes Mittel wegen der zu Nebenprodukten führenden Reaktion zwischen Base und Säurechlorid nicht möglich war.

Um diese Störung zu umgehen, wurde das in abs. Äther suspendierte Kollagen unter langsamem Zutropfen von 0,5 normaler methanolischer Kalilauge mit dem gleichfalls in kleinen Portionen zugesetzten Dithiodiglykolsäure-Dichlorid bei pH 9,0 umgesetzt.

Bei Verwendung von methanolischer Kalilauge als Base war zwar wegen des im Gleichgewicht vorhandenen Alkoholats mit einer teilweisen Veresterung des Alkohols durch das im Überschuss eingesetzte Säurechlorid zu rechnen. Im vorliegenden Falle konnte jedoch mit Sicherheit angenommen werden, dass die Acylierungsreaktion zwischen ϵ -Aminogruppe und Säurechlorid die raschere und damit bevorzugte Reaktion sein würde. Eine Analyse des Produktes ergab, dass 1,09 % S neu eingeführt worden waren (Tab. 3). Gleichzeitig hatte sich der Schrumpfungspunkt um 6° erhöht. Im Gegensatz zu unbehandeltem Kollagen quoll das Produkt nicht mehr in 0,5 %-iger Essigsäure.

Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass das bifunktionelle Säurechlorid durch Reaktion mit ϵ -Aminogruppen, welche zwei verschiedenen Polypeptidketten des Kollagens angehören, zur Ausbildung von Quervernetzungen befähigt ist. Bei quantitativer bifunktionaler Reaktion sollte die zusätzlich eingeführte Schwefelmenge 1,12 % betragen. Für quantitative monofunktionelle Reaktion wurde ein Wert von 2,24 % errechnet. Die Zahlen gelten unter der Voraussetzung, dass sämtliche substituierbaren Basen mit dem Säurechlorid reagiert haben. Um einen Anhaltspunkt über das Ausmass von Mono- und Bisubstitution zu gewinnen, wurden die Disulfidbindungen reduziert. Wenn alle Dithiodiglykolsäurereste in bifunktionaler Bindung vorliegen, sollte sich bei der Reduktion der Schwefelgehalt des substituierten Kollagens nicht ändern. Waren dagegen alle Dithiodiglykolsäurereste monofunktionell gebunden, dann sollte der Schwefelgehalt des Kollagens bei der Spaltung der Disulfidbindungen auf die Hälfte absinken.

Nach Reduktion des Produktes mit Na-Thioglykolat unter erproben, bei

2. a) β) beschriebenen Bedingungen und nach gründlichem Auswaschen sank der Gehalt an neu eingeführtem S von 1,09% auf 0,66%, während der Schrumpfungspunkt auf 67° C zurückging.

Tab. 3

Schwefelgehalt und Schrumpfungspunkte thioglykolyli substituierter Präparate von Sehnenkollagen

Behandlung von Sehnenkollagen	Gesamt-S %	S neu eingeführt %	berechnete Menge S (bei quantitativer Substitution %)	mMol S neu eingeführt pro Gramm Kollagen	TS
Kontrolle (unbehandelt)	0,32	-	-	-	66°
S-Benzyl-Thioglykolsäure-Chlorid in Pyridin	1,40	1,08	1,04	0,39	60°
Dithiodiglykolsäure-Dichlorid in methanol. KOH	1,41	1,09	1,12 ⁺ 2,24 ⁺⁺	0,39	72°
----- anschliessend reduziert mit Thioglykolat	0,98	0,66	1,12	0,20	67°
Dithiodiglykolsäure-Anhydrid in Triäthylamin	2,01	1,69	2,24	0,53	68°
----- anschliessend reduziert mit Thioglykolat	1,18	0,86	1,12	0,27	60°

+ bei quantitativer bifunktioneller Reaktion

++ bei quantitativer monofunktioneller Reaktion

Diese Ergebnisse lassen darauf schliessen, dass zur Hauptsache eine monofunktionelle Reaktion stattgefunden hat, wobei insgesamt etwa drei Viertel aller substituierbaren Basen mit dem Säurechlorid reagiert haben. Eine gewisse Menge an bifunktionell gebundenem Reagens muss jedoch angenommen werden, da die Erhöhung des Schrumpfungspunktes um 6°C nur auf neu eingebaute Quervernetzungen zurückgeführt werden kann. Nach Spaltung der Disulfidbrücken durch Reduktion ging der Schrumpfungspunkt auf den im Ausgangsmaterial bestimmten Wert zurück.

c) Umsetzung von Sehnenkollagen mit Dithiodiglykolsäure-Anhydrid

Bei der Umsetzung von Sehnenkollagen mit dem Anhydrid der Dithiodiglykolsäure musste erneut die hohe Reaktionsfähigkeit disulfidhaltiger Acylierungsmittel beachtet werden. Im vorliegenden Fall wurde die Reaktion in absolutem Aceton durchgeführt. Zur Bindung der bei der Reaktion frei werdenden Säure wurde Triäthylamin verwendet, doch durfte davon nur eine sehr geringe Menge eingesetzt werden, um eine Verharzung des cyclischen Anhydrids zu verhindern. Es wurde daher das Triäthylammoniumsalz des Kollagens verwendet, welches 20 Stunden mit einer Lösung von Dithiodiglykolsäure-Anhydrid behandelt wurde. Nach gründlichem Auswaschen des Produktes mit organischen Lösungsmitteln wurde die Umsetzung unter gleichen Bedingungen noch zweimal wiederholt. Durch Vermeidung grösserer Mengen Triäthylamin konnte auf diese Weise die Nebenreaktion fast ganz ausgeschaltet werden. Sie machte sich lediglich durch eine schwache Braunfärbung des Reaktionsgemisches bemerkbar. Durch die dreimalige Umsetzung sollte eine möglichst quantitative Substitution der basischen Gruppen erzielt werden.

Das Produkt wurde gründlich mit Phosphatpuffer (pH 8,5), Wasser, Aceton, Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Eine Analyse ergab, dass 1,69 % S neu eingeführt worden waren (Tab. 3). Dies entspricht einer etwa 75%-igen Substitution der ϵ -Aminogruppen des Kollagens.

Nach Reduktion des Produktes mit Na-Thioglykolat und gründlichem Auswaschen war der S-Gehalt auf 0,86 % gesunken. Diese Abnahme des S-Gehaltes um etwa die Hälfte der ursprünglich eingeführten Menge

stimmt gut mit der Vorstellung überein, dass von dem monofunktionellen Dithiodiglykolsäure-Anhydrid nach Reaktion mit einer ϵ -Aminogruppe des Kollagens, durch die Reduktion der Disulfidbindung ein Molekül Thioglykolsäure abgespalten wird.

d) Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Fibrillen aus Sehnenkollagen, dessen ϵ -Aminogruppen durch Acylierung mit S-Benzyl-Thioglykolsäure-chlorid blockiert worden waren, ergab nach "Anfärbung" mit Phosphorwolframsäure (PWS) eine hochunterteilte Querstreifung, wie sie von Kühn (10b) auch an Acetylkollagen beobachtet wurde (EM-Aufnahme Nr. I)⁺. Die Perioden von 640 Å Länge liessen sich in 7 - 8 Querstreifen auflösen. Eine zur Einführung von Schwermetallen erforderliche Abspaltung der SH-Schutzgruppe am nativen Material war, wie berichtet, nicht möglich.

EM-Aufnahme Nr. II zeigt Fibrillen des mit Dithiodiglykolsäure-Dichlorid umgesetzten Kollagens vor der Reduktion der Disulfidbrücken nach "Anfärben" mit PWS. Eine Verbesserung des Querstreifungsmusters durch eingeführte Disulfidbrücken war nicht zu beobachten. Offenbar reicht der Anteil an zusätzlich eingeführten Vernetzungen zwischen den ϵ -Aminogruppen nicht aus, um eine Fixierung oder gar Verbesserung des in der Fibrille bereits vorgegebenen Ordnungszustandes in der EM-Aufnahme sichtbar werden zu lassen.

Das Bild zeigt eine deutliche, normale, wenn auch nicht hochunterteilte Querstreifung. Bei einem frisch reduzierten, in der SH-Form vorliegenden, nicht "angefärbten" Präparat (EM-Aufnahme Nr. III), erkennt man eine zwar verschwommen erscheinende, aber durchaus normale Querstreifung, wie sie auch für unbehandeltes Kollagen charakteristisch ist. EM-Aufnahme Nr. III a zeigt das gleiche Produkt nach "Anfärbung" mit PWS.

Ein Vergleich der EM-Aufnahme Nr. III mit Aufnahme Nr. III b und Nr. III c lässt erkennen, dass eine Behandlung des reduzierten, in der SH-Form vorliegenden Präparates mit 2%-igen Lösungen von Silbernitrat (Nr. III b) bzw. Bleiacetat (Nr. III c) keine Intensivierung des a-Streifens - in welchem nach Kühn (10f) die basischen Aminosäuren besonders stark angereichert sind - zur Folge hatte.

Ähnliche Verhältnisse ergaben sich bei der Untersuchung der mit dem

⁺ EM-Aufnahmen siehe Teil VII. S. 98

cyclischen Dithiodiglykolsäure-Anhydrid umgesetzten Proben. EM-Aufnahme Nr. IV zeigt das acylierte, unreduzierte, EM-Aufnahme Nr. V das reduzierte Produkt nach "Anfärbung" mit PWS und Uranylacetat (UAc). Bei dem reduzierten und mit Silber beladenen Präparat konnte eine gute Unterteilung und Schärfe der Querstreifung (7-8 Streifen pro Periode) nur durch eine "Anfärbung" mit PWS und UAc erreicht werden (EM-Aufnahme Nr. V a). Zusätzliche Effekte durch den Einbau von Silber und Blei in die basischen Bereiche der Faser waren demnach entgegen den Erwartungen die zur Bearbeitung dieses Themas geführt haben, nicht zu verzeichnen. Offenbar ist die Wirkung der eingelagerten Schwermetallatome noch zu gering, um elektronenmikroskopisch erkannt werden zu können.

Eine Schädigung der nativen Faser durch die Bedingungen der Acylierungsreaktion wurde in keinem Falle beobachtet.

4. Diskussion der Ergebnisse

Die Einführung von SH-gruppenhaltigen Substituenten in Kollagen wurde mit drei verschiedenen Acylierungsmitteln versucht. Diese sollten mit den ϵ -Aminogruppen des Kollagens zur Reaktion gebracht werden. Der erste Weg bestand in der Verwendung von S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid. Nach erfolgter Substitution sollte die S-Benzylgruppe durch Natrium in flüssigem Ammoniak abgespalten und damit die SH-Gruppe freigelegt werden. Modellversuche mit n-Butylamin hatten gezeigt, dass eine Substitution von Aminogruppen mit dem Säurechlorid bereits oberhalb pH 7 mit guter Ausbeute durchführbar ist. Am Kollagen gelang in Pyridinsuspension eine quantitative Substitution der ϵ -Aminogruppen, wie aus einer Bestimmung des eingeführten Schwefels (0,39 mMol/g) hervorgeht. Es erwies sich dann aber als undurchführbar, die S-Benzylgruppen des modifizierten Kollagens abzuspalten, da sich das Protein unter Einwirkung von Natrium in flüssigem Ammoniak zersetzt. Nachdem dieser Weg versperrt war, wurde der Versuch unternommen, disulfidhaltige Acylierungsmittel einzusetzen und nach erfolgter Substitution durch Reduktion freizulegen. Als Acylierungsmittel wurden Dithiodiglykol-

säure-Dichlorid und das bisher noch unbekannte cyclische Anhydrid der Dithiodiglykolsäure eingesetzt. Beide erwiesen sich als brauchbar, wenn auch bei der Acylierungsreaktion besondere Schwierigkeiten zu überwinden waren.

Modellversuche hatten bereits gezeigt, dass die beiden Reagentien sehr labil waren, sowohl gegen Spuren von Wasser als auch gegen tertiäre Amine wie Pyridin oder Triäthylamin, die üblicherweise zur Bindung der Säure, welche bei der Acylierung frei wird, angewendet werden. Tertiäre Basen führten zur Bildung dunkel gefärbter harziger Produkte. Wurde dagegen das primäre Amin, welches acyliert werden sollte, im Überschuss angewandt, um auch die frei werdende Säure zu binden, dann liess sich die Reaktion glatt durchführen.

Zur Substitution der Aminogruppen des Kollagens musste nach diesen Erfahrungen ein besonderer Weg eingeschlagen werden. Im Falle der Verwendung von Dithiodiglykolsäure-Dichlorid gelang eine Substitution ohne Bildung harziger Nebenprodukte, indem zur ätherischen Suspension ein Überschuss an Säurechlorid zugetropft und die entstehende Säure mit methanolischer KOH in dem Masse abgefangen wurde, in dem sie sich bildete. Unter diesen Bedingungen wurden die ϵ -Aminogruppen zu etwa 75% substituiert, wobei das Acylierungsmittel zur Hauptsache monofunktionell in geringem Masse aber auch bifunktionell mit den ϵ -Aminogruppen des Kollagens reagiert hatte. Dies ging aus den Ergebnissen der anschliessenden Reduktion hervor.

Cyclisches Dithiodiglykolsäure-Anhydrid liess sich nach dem gerade beschriebenen Weg wegen seiner hohen Empfindlichkeit mit Kollagen nicht umsetzen. Eine Substitution gelang jedoch, als triäthylamin-vorbehandeltes Kollagen, in welchem die ϵ -Aminogruppen in entladnem Zustand vorliegen und die Carboxylgruppen durch Triäthylamin abgesättigt sind, mit dem Anhydrid zur Reaktion gebracht wurde. Die entstehende freie Säure wurde entweder durch einen Teil der Aminogruppen des Kollagens oder durch anhaftendes Triäthylamin gebunden. Nach dreimaliger Durchführung der Reaktion jeweils nach erneuter Triäthylaminbehandlung waren 75 % der ϵ -Aminogruppen acyliert.

Die Reduktion der nach den beiden Verfahren eingeführten Disulfidgruppen mit Hilfe von Thioglykolsäure verlief glatt. Im Falle des mit dem bifunktionellen Säurechlorid substituierten Kollagens ergaben sich bei der Reduktion Veränderungen in der Schrumpfungstemperatur, wie sie nach Ergebnissen anderer Autoren (siehe unten) zu erwarten waren. Die Einführung SH-haltiger Substituenten in Kollagen ist somit als gelöst anzusehen. In diesen untersuchten Fällen hatten etwa 75% der ϵ -Aminogruppen reagiert.

In diesem Zusammenhang mögen drei Arbeiten Erwähnung finden, in denen - wenn auch mit anderem Ziel - gleichfalls die Einführung von Sulfhydrylgruppen in Proteine beschrieben wird. So gelang es Schöberl (72) durch Umsetzung von Polythioglykoliden, die durch Kondensation von Thioglykolsäure unter Wasserabspaltung entstehen, mit löslichen Eiweißstoffen (Ovalbumin, Casein) die ϵ -Aminogruppen unter Einführung von Thioglykolsäureresten zu substituieren.

Klotz und Heiney (73) haben zum gleichen Zweck das S-Acetyl-Mercaptobornsteinsäureanhydrid verwendet. In diesem Falle muss allerdings die Einführung einer zusätzlichen Carboxylgruppe in Kauf genommen werden. Die Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppe wurde durch verdünnte NaOH bei pH 11,5 innerhalb weniger Minuten erreicht.

Über sehr ähnliche Resultate wie sie in der vorliegenden Arbeit beschrieben sind, berichteten nach dem experimentellen Abschluss meiner Untersuchungen (siehe dazu Bericht über die Diplomarbeit vom 28.4.1961) Schade und Zahn (74). Den Autoren war es gelungen, Sehnenkollagen mit dem Bis-o-nitrophenylester von Bis-carbobenzoxycystin umzusetzen. Das isolierte Produkt enthielt 5,5 % Schwefel entsprechend 1,1 mMol Disulfidbindungen/g Kollagen. Diese Menge ist wesentlich grösser als sie einer Substitution der ϵ -Aminogruppen (0,315 mMol/g) entsprechen würde. Möglicherweise wurden bei dieser Reaktion auch Imidazolreste und Hydroxylgruppen in den Seitenketten des Kollagens substituiert.

Sowohl die Reaktion von Schade und Zahn mit dem bifunktionell aktivierten Cystinderivat als auch die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Umsetzung von Kollagen mit Dithiodiglykolsäure-Dichlorid führten zu einem

Ansteigen der Schrumpfungstemperatur um etwa $5 - 6^{\circ}$. Das kann durch eine Vernetzung der Peptidketten durch die bifunktionellen Reagentien erklärt werden. Reduktion der Disulfid-Quervernetzungen machte diesen Effekt in beiden Fällen rückgängig. Eine Erhöhung der Schrumpfungstemperatur um einen ähnlichen Betrag wurde von Zahn (71) auch bei der Vernetzung von Kollagen mit Difluordiphenylsulfon beobachtet. Neben einer bevorzugten monofunktionellen Reaktion fand demnach bei all diesen Umsetzungen in geringerem Umfang auch ein bifunktioneller Angriff statt. Offenbar liegt nur ein bestimmter Teil der ϵ -Aminogruppen des Kollagens in einer für Vernetzungen günstigen sterischen Lage vor.

Nachdem es gelungen war, Kollagen mit SH-gruppenhaltigen Substituenten zu besetzen, erhob sich die Frage, ob es möglich ist, diese Gruppen nach Beladen mit Schwermetallen elektronenmikroskopisch zu lokalisieren. Veränderungen im elektronenmikroskopischen Bild der thioglykolatsubstituierten Kollagenproben wären nach Einlagerung von Ag- oder Pb-Salzen vor allem in den a-Streifen zu erwarten gewesen; in diesen sind wie die Arbeiten von Kühn (10f) gezeigt haben, basische Aminosäuren besonders stark angereichert. Leider erwiesen sich die Effekte als zu gering, um deutliche Unterschiede zwischen den Präparaten vor und nach Behandlung mit Blei- oder Silbersalzen zu erkennen. Es ist jedoch zu erwarten, dass es mit Hilfe von Röntgenstrukturuntersuchungen gelingt, die neu eingeführten Schwermetallatome zu lokalisieren.

Möglicherweise ist das Ausbleiben einer Intensitätssteigerung bestimmter Querstreifen nach Beladen von Thioglykolatkollagen mit Ag- oder Pb-Salzen darauf zurückzuführen, dass diese Schwermetalle den Ordnungszustand der Fibrillen wegen ihrer geringen Wertigkeit nicht zu verbessern vermögen. Eine solche Wirkung ist für das Zustandekommen einer gut ausgebildeten Querstreifung wesentlich, wie bereits auf Seite 3 ausgeführt wurde.

II. Zur Frage der Beteiligung von ϵ -Aminogruppen an der Quervernetzung

Im vorliegenden Kapitel war die Frage zu klären, ob alle ϵ -Aminogruppen des Tropokollagens und Kollagens in freier Form vorliegen oder ob nicht vielleicht ein Teil davon substituiert ist. Dieser Frage kommt eine grosse

Bedeutung bei der Diskussion der chemischen Natur der Quervernetzungen des Kollagens zu. Sind alle ϵ -Aminogruppen Substitutionsreaktionen zugänglich, dann kann man ausschliessen, dass sie an den Vernetzungen beteiligt sind, etwa durch Ausbildung von Amidbindungen mit ω -Carboxylgruppen von Asparagin- und Glutaminsäureresten benachbarter Peptidketten.

Über die Zugänglichkeit der ϵ -Aminogruppen liegen sehr unterschiedliche Befunde vor. So fanden Bowes und Moss (38), dass nur 55 - 60% der ϵ -Aminogruppen des Lysins mit Dinitrofluorbenzol reagieren. Levy, Fishman und Cabrera (39) behandelten Sehnenkollagen mit Nitrosylchlorid und stellten fest, dass 35% der ϵ -Aminogruppen des Lysins intakt blieben, also nicht in freier Form vorliegen sollten, während der Rest zerstört wurde. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu denen anderer Autoren (75, 76, 77, 10b), die fanden, dass die ϵ -Aminogruppen des Lysins im Kollagen in weit höherem Masse Substitutionsreaktionen zugänglich sind.

Für eine geringe Substitution der ϵ -Aminogruppen im Kollagen spricht die Tatsache, dass Mechanic und Levy (40) aus sauren Partialhydrolysaten von Gelatine die Isolierung des Peptids N^{ϵ} -(Glycyl- α -glutamyl)-lysin gelang. Die Ausbeute entsprach jedoch weniger als einem Prozent des Lysinanteils des Kollagens, das sind weniger als 0,03 Mol Lysin pro 100 Mol Aminosäuren.

1. Restbasenbestimmung an dinitrophenyliertem nativem und denaturiertem Tropokollagen und Kollagen.

Als einfacher quantitativ exakt durchführbarer Weg zur Klärung der Zugänglichkeit der ϵ -Aminogruppen für Substitutionsreaktionen bot sich die Möglichkeit an, Tropokollagen oder Kollagen mit Dinitrofluorbenzol umzusetzen und im Reaktionsprodukt nach saurer Hydrolyse freies Lysin und Hydroxylysin quantitativ zu bestimmen. Führt man diese Bestimmung im Aminosäureanalysator durch, in dem die basischen Aminosäuren an einer kleineren Kationenaustauschersäule getrennt analysiert werden, dann kann man den gleichzeitig mitgemessenen Arginingehalt des Materials, der durch die Dinitrophenylierung nicht beeinflusst wird, als Bezugswert

für die eingesetzte Kollagenmenge verwenden. Diese Bezugsmethode ist wesentlich günstiger als eine Berechnung auf die Einwaage, nachdem das substituierte Kollagen gewichtsmässig nicht ohne weiteres mit dem unbehandelten verglichen werden kann und eine N-Bestimmung wegen der eingeführten DNP-Reste keine verlässlichen Werte liefert.

Möglicherweise waren die von den verschiedenen Autoren mitgeteilten Werte über die Substituierbarkeit der Aminosäuren des Kollagens darauf zurückzuführen, dass im nativen Kollagen ein Teil dieser Gruppen maskiert vorliegt und erst beim Denaturieren zugänglich wird. Um diese Möglichkeit auszuschliessen, wurde versucht, die ϵ -Aminogruppen von reifem Kollagen und von Tropokollagen vor und nach Denaturierung, bei pH 9,0 mit Dinitrofluorbenzol umzusetzen. Um eine Renaturierung des denaturierten Materials während der Umsetzung zu vermeiden, wurde in 2,5 m NaClO_4 -Lösung dinitrophenyliert. Unter diesen Bedingungen geht das Tropokollagen in Lösung, um erst nach beendeter Dinitrophenylierung zum Teil wieder auszufallen. Reifes Kollagen bleibt dagegen ungelöst.

Tab. 4

Analyse der basischen Aminosäuren von unbehandeltem und dinitrophenyliertem Prokollagen und Kollagen. Angaben in Mol/100 Mol Aminosäuren.

	His	Lys	Hyllys	Arg ⁺⁾
Tropokollagen				
unbehandelt	0,65	2,88	0,50	5,45
nativ dinitrophenyliert.....	0,23	1,26	0,22	5,45
in 2,5 m NaClO_4 dinitrophenyliert...	0,08	0,07	0,08	5,45
Kollagen				
unbehandelt.....	0,60	2,70	0,55	5,35
nativ dinitrophenyliert.....	0,06	0,27	0,11	5,35
in 2,5 m NaClO_4 dinitrophenyliert..	0,15	0,10	0,12	5,35

⁺⁾ Zur Berechnung der Werte wurde der Arginingehalt der dinitro-

phenylierten Proben und des Ausgangsmaterials gleichgesetzt (siehe dazu die Ausführungen im Text S. 34).

Aus Tab. 4 geht hervor, dass in Tropokollagen und Kollagen noch bestimmte Mengen an Lysin und Hydroxylysin nachweisbar sind, wenn die Dinitrophenylierung unter nativen Bedingungen durchgeführt wurde. Dieser Anteil ist im nativen Protein einer Dinitrophenylierung offenbar nicht zugänglich. Nach Umsetzung in Gegenwart von 2,5 n NaClO_4 finden sich nur noch sehr kleine Mengen an Lysin und Hydroxylysin im Hydrolysat. Die nach der Methode von Moore und Stein (69)⁺ ermittelten Werte liegen an der Grenze einer sicheren Erfassung.

Das bedeutet, dass die Fehlbeiträge von 30% und mehr (38, 39) sicher vorgetäuscht sind. Andererseits kann das Vorliegen kleinster Mengen von Quervernetzungen, die auf das physikalische Verhalten unter Umständen von grossem Einfluss sein können, nicht ausgeschlossen werden.

Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit der ϵ -Aminogruppen in Tropokollagen und Kollagen in Gegenwart von 2,5 m NaClO_4 wurden nicht beobachtet.

Diese Befunde sprechen gegen eine entscheidende Beteiligung von ϵ -Aminogruppen an hauptvalenzmässigen Quervernetzungen zwischen Tropokollagenmolekülen.

2. Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, dass die ϵ -Aminogruppen von Tropokollagen und Kollagen in freier Form vorliegen. Sie können am denaturierten Protein vollständig substituiert werden. Am nativen Material dagegen ist eine quantitative Substitution erschwert. Zu ähnlichen Resultaten kam Gallop (76), der zeigen konnte, dass durch Guanidierung von nativem Ichthyocoll 87% des Lysins, bei der Umsetzung von hitzedenaturiertem Ichthyocoll dagegen 94% des Lysins in Homoarginin übergeführt werden. Durch die Denaturierung des Kollagens, die von einer Sprengung der Wasserstoffbrückenbindungen sowie im Falle des reifen Kollagens von

⁺ Apparatur nach der Modifikation von K. Hannig

einer erheblichen Quellung begleitet ist, wird die Proteinstruktur zerstört. Auf diese Weise wird offenbar auch der im nativen Material nicht substituierbare Anteil an freien ϵ -Aminogruppen einer Dinitrophenylierung zugänglich gemacht.

Widersprechende Ergebnisse anderer Autoren, z.B. der bereits erwähnten Untersuchungen von Bowes und Moss (38), die nur 55 - 60% der

ϵ -Aminogruppen des Lysins mit Dinitrofluorbenzol umsetzen konnten, mögen darauf zurückzuführen sein, dass sie eine Renaturierung der denaturierten Produkte während der Reaktion nicht ganz vermeiden konnten.

Auf Grund der Tatsache, dass die ϵ -Aminogruppen des Kollagens unter geeigneten Bedingungen vollständig dinitrophenyliert werden, darf man schliessen, dass sie an Quervernetzungen nicht in nennenswertem Umfang beteiligt sein können. Sollte es sich allerdings um eine Vernetzung durch sehr geringe Mengen an Lysin oder Hydroxylysin handeln, etwa in der Grössenordnung von einem Mol pro 1.000 Mol Aminosäuren, dann ist die Genauigkeit der angewendeten Methode überfordert. Wie man aus Tabelle 4 ersehen kann, werden nach Hydrolyse der DNP-Proteine von allen untersuchten in den Seitenketten durch Dinitrofluorbenzol substituierbaren Aminosäuren noch Mengen in der Grössenordnung von 0,1 Mol pro 100 Mol Aminosäuren in freier Form festgestellt. Diese geringen Anteile, die an der Grenze des Erfassbaren liegen, stammen wahrscheinlich von einer geringen Spaltung der DNP-Verbindungen während der Hydrolyse.

Schliesslich wäre noch der Befund von Mechanic und Levy (40) zu diskutieren, nach dem aus sauren Partialhydrolysaten von Gelatine N^{ϵ} -(Glycyl- α -glutamyl-)lysin gewonnen worden war. Das Vorhandensein dieses Peptides würde dafür sprechen, dass ϵ -Aminogruppen des Kollagens an Quervernetzungen beteiligt sind. Die Menge des isolierten Peptides entspricht aber weniger als 0,03 Mol Lysin pro 100 Mol Aminosäuren. Aus Untersuchungen an Bacitracin A (78) ist bekannt, dass die von ϵ -Aminogruppen des Lysins ausgehenden Peptidbindungen gegen saure Hydrolyse ausserordentlich beständig sind. Wenn daher ein grösserer Teil der im Kollagen enthaltenen ϵ -Aminogruppen des Lysins tatsächlich an derartigen Bindungen beteiligt wäre, sollte die Aufarbeitung zu einer weit grösserer

Ausbeute an ϵ -NH₂-Lysinpeptiden führen. Möglicherweise handelt es sich bei dem isolierten Lysinpeptid sogar um ein Artefakt, das bei der Gelatineherstellung entstanden sein könnte, indem veresterte Carboxylgruppen von Glutaminsäureresten mit nachbarständigen Aminogruppen unter Amidbildung reagiert hatten. Eine solche Amidierungsreaktion durch Estergruppen ist bei den alkalischen Bedingungen der Gelatineherstellung durchaus denkbar; sie steht in Analogie zur Reaktion von Estergruppen mit Hydroxylamin oder Hydrazin unter alkalischen Bedingungen, wobei sich Hydroxamsäuren oder Säurehydrazide bilden.

III. Methoden und Ergebnisse zur α -Aminoendgruppenbestimmung an Kollagen.

In der Einleitung war bereits darüber berichtet worden, dass die bisherigen Versuche, Aminoendgruppen im Kollagen nachzuweisen, keine positiven Ergebnisse gezeigt hatten. Viele dieser Versuche waren jedoch zu einem Zeitpunkt ausgeführt worden, zu dem über die Grösse des Tropokollagenmoleküls noch keine entsprechenden Angaben vorlagen. Seitdem jedoch aus Untersuchungen von Boedtker und Doty (3) sowie von Rich und Crick (4) bekannt ist, dass Tropokollagen einerseits ein Mol.-Gewicht von 360.000 besitzt und andererseits aus drei Peptidketten aufgebaut ist, ist klar geworden, dass es sich höchstens um sehr geringe Mengen an Endgruppen handeln kann, die möglicherweise bei den bisher angewendeten Methoden nicht erfasst worden sind. Es stellte sich daher die Aufgabe, die Bestimmung der Aminoendgruppen erneut zu überprüfen und zwar mit einer entsprechend empfindlichen Methode, die auch Mengen von einem Mol pro 1.000 Mol Aminosäuren mit Sicherheit zu erfassen gestattet.

Im folgenden sei zunächst die Bestimmungsmethode näher ausgeführt.

1. Methoden

Die Aminoendgruppen des Kollagens wurden nach der DNP-Methode von Sanger (45) bestimmt. Um das Verfahren entsprechend empfindlich zu machen, mussten für sämtliche Reaktionsschritte - Dinitrophenylierung, Hydrolyse, chromatographische Trennung der DNP-Aminosäuren - optimale Bedingungen entwickelt werden.

a) Umsetzung von nativem und denaturiertem Tropokollagen und Kollagen mit Dinitrofluorbenzol (DNFB)

Die Kollagenproben wurden in allen Fällen in wässrig-alkalischer Lösung bei pH 9,0 dinitrophenyliert.

Wie die in Teil II beschriebenen Ergebnisse gezeigt hatten, konnte durch Umsetzung in Gegenwart von 2,5 m NaClO_4 eine vollständige Substitution der ϵ -Aminogruppen erreicht werden. Um die α -Aminoendgruppen gleichfalls möglichst quantitativ erfassen zu können, wurde daher sowohl natives wie denaturiertes Tropokollagen und Kollagen mit DNFB umgesetzt.

α) Tropokollagen:

Zur Dinitrophenylierung des nativen Tropokollagens in homogener Lösung wurde es zunächst in Citratpuffer (pH 3,3) gelöst. Durch Zusatz von 4 m NaCl -Lösung wurde die Ionenstärke soweit erhöht, dass bei der anschliessenden Einstellung des pH-Wertes auf 9,0 mit 2 n NaOH ein Ausfallen des gelösten Materials verhindert werden konnte. Während des Verlaufs der Reaktion beginnt ein Teil des umgesetzten Tropokollagens allmählich auszufallen.

Nach erfolgter Dinitrophenylierung und Extraktion des überschüssigen DNFB wurden die Salze durch Dialyse entfernt. Die wässrige Suspension, die noch viel gelöstes DNP-Protein enthält, wurde anschliessend gefriergetrocknet. Durch die Gefriertrocknung erhält man ein lockeres Material, was für eine Entfernung des durch Dinitrophenylierung im wässrigen Milieu in grossen Mengen gebildeten und zum Teil noch fest an der Faser haftenden Dinitrophenols (DNP-OH) durch Extraktion mit Äthanol von Vorteil ist.

In einem Parallelversuch wurde, wie in Teil II beschrieben, Tropokollagen zur Denaturierung in 2,5 m NaClO_4 gelöst, in Anwesenheit des Denaturierungsmittels dinitrophenyliert und in gleicher Weise aufgearbeitet.

β) Kollagen:

Die Umsetzung von reifem, nativem Kollagen mit DNFB erfolgte in einer 4%-igen NaHCO_3 -Lösung (pH 9,0), in der das Kollagen suspendiert wurde. Im Falle des denaturierten Kollagens wurde analog der Umsetzung von Tropokollagen in Gegenwart von 2,5m NaClO_4 dinitrophenyliert. Unter

diesen Bedingungen quillt das Material sehr stark, geht jedoch im Gegensatz zu Tropokollagen nicht in Lösung.

Die Proben konnten nach erfolgter Umsetzung durch gründliches Auswaschen auf der Nutsche gereinigt werden. Zur Entfernung des DNP-OH konnte jedoch auch hier auf eine gründliche Extraktion mit Äthanol nicht verzichtet werden. Eine quantitative Entfernung des DNP-OH war, wie die Kurve Abb. 4 und Tab. 7, sowie das Dünnschichtchromatogramm Abb. 5 zeigen, in keinem Falle möglich.

Über die gleichen Schwierigkeiten bei der Abtrennung des DNP-OH berichtet Altenschöpfer (79) bei seinen Untersuchungen an DNP-Perlon sowie an DNP-Haut.

b) Schonende Hydrolyse in zwei Stufen

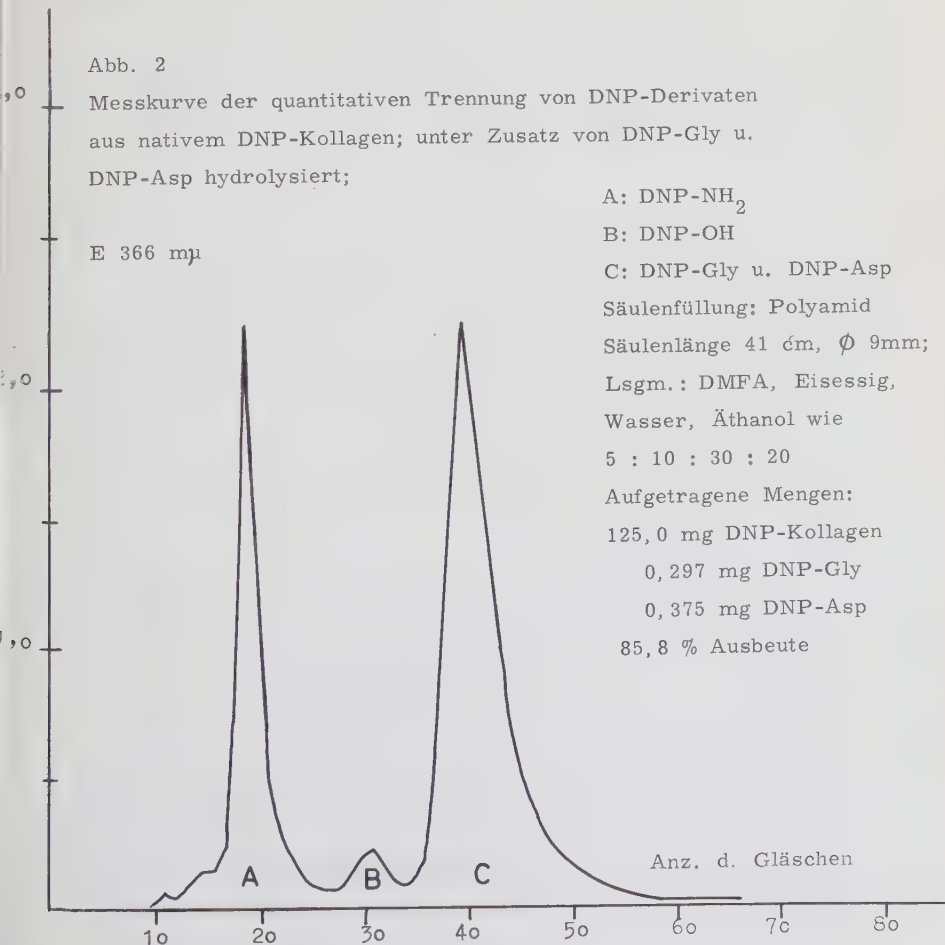
Die Hydrolyse des DNP-Kollagens sollte unter möglichst schonenden Bedingungen durchgeführt werden. Eine gewisse Labilität vieler DNP-Aminosäuren gegenüber saurer Hydrolyse ist seit langem bekannt und immer wieder beschrieben worden (46b). So finden sich in der Literatur zahlreiche Beispiele dafür, dass 2 - 24-stündige Hydrolyse in 6n HCl die Ausbeuten einiger Aminosäuren auf 0 - 20 % verringert hat (46b, 80). Es musste daher damit gerechnet werden, dass die Aminoendgruppen möglicherweise aus diesem Grunde im Kollagen bisher nicht nachgewiesen werden konnten (38, 48, 49).

Zur Hydrolyse der dinitrophenylierten Kollagenproben kam deshalb eine von Deasy (56) beschriebene 2-Stufen-Hydrolyse zur Anwendung, die im Verlaufe dieser Arbeit eingehend studiert wurde. So war vor allem zu klären, wie hoch die Verluste an DNP-Aminosäuren bei dieser Methode noch sind. Andererseits galt es festzustellen, ob diese Methode auch tatsächlich zu einer quantitativen Hydrolyse des DNP-Proteins führt.

Während der ersten Stufe wurden die Kollagenproben 4 h lang in 2n HCl am Rückfluss gekocht. Hierbei geht das DNP-Kollagen bereits während der ersten Min. in Lösung. Nach Abkühlen und gründlicher Extraktion mit Äther wurde die wässrige Phase mit konz. HCl auf 6n gebracht und erneut 4 h am Rückfluss erhitzt. Auf diese Weise wurde die Hauptmenge der leichter abspaltbaren dinitrophenylierten α -Aminoendgruppen in der ersten Stufe bei relativ kurzer Hydrolysezeit in sehr stark verdünnter

Säure frei, wobei grössere Verluste vermieden wurden. Während der zweiten Stufe wurde dann der fester gebundene, wesentlich kleinere Anteil durch stärkere Säure abgespalten (Abb. 8).

Nach erneuter Extraktion des abgekühlten Hydrolysats wurden die Äther-extrakte vereinigt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels blieben die DNP-Aminosäuren zurück. Sie wurden durch Säulenchromatographie an Polyamid und zur vergleichenden Kontrolle durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel qualitativ und quantitativ bestimmt.



Im Verlauf dieser Untersuchungen ergab sich sehr bald, dass in allen untersuchten Kollagenpräparaten nur DNP-Glycin und DNP-Asparaginsäure in quantitativ noch gut bestimmbar Mengen auftreten, während DNP-Glutaminsäure, DNP-Serin und DNP-Alanin je nach untersuchtem Material, nur in Spuren nachweisbar waren.

Zur Ermittlung der durch Hydrolyse bewirkten Verluste an DNP-Gly und DNP-Asp wurden beide DNP-Aminosäuren in einem Versuch jeweils einzeln, in einem zweiten Versuch gemeinsam den Bedingungen der Hydrolyse unterworfen. Schliesslich wurden DNP-Asp und DNP-Gly einzeln mit je 0,5 g DNP-Kollagen hydrolysiert und darauf beide DNP-Aminosäuren zusammen mit 0,5 g DNP-Kollagen. Das Ergebnis dieses letztgenannten Versuchs zeigt Abb. 2. In allen Fällen wurden die Ausbeuten durch Säulenchromatographie an Polyamid genau bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 5 wiedergegeben.

Tab. 5

Ausbeute an DNP-Gly und DNP-Asp nach Hydrolyse

A. Hydrolyse ohne Zusatz
von DNP-Kollagen
Hydrolysebedingungen:
4 h in 2nHCl am
Rückfluss

Ansatz	% Ausbeute
1, 2mg DNP-Gly	64, 2
1, 5mg DNP-Asp	79, 6
2, 4mg DNP-Gly + 3, 0mg DNP-Asp	74, 2

B. Hydrolyse unter
Zusatz von DNP-
Kollagen
Hydrolysebedingungen:
4 h in 2n HCl am
Rückfluss, nach
Extraktion erneut
4 h in 6n HCl am
Rückfluss.

Ansatz	% Ausbeute
0, 5g DNP-Kollagen + 1, 5mg DNP-Asp 1, 2mg DNP-Gly	85, 8
0, 5g DNP-Kollagen + 1, 5mg DNP-Asp	96, 4
0, 5g DNP-Kollagen + 1, 2mg DNP-Gly	86, 9

Aus den Werten in Tab. 5 A und B geht folgendes hervor:

Tab. 5 A.

1. DNP-Gly ist gegen saure Hydrolyse weniger resistent als DNP-Asp. Die Verluste betragen 35 bzw. 20 %.
2. Setzt man beide DNP-Aminosäuren gemeinsam den Bedingungen der Hydrolyse (2n HCl, 4 h am Rückfluss) aus, so beträgt der Gesamtverlust an beiden etwa 25 %.

Tab. 5 B.

3. Hydrolysiert man DNP-Asp bzw. DNP-Gly mit 0,5 g DNP-Kollagen, so verringern sich die Verluste um 15 - 20 %.
4. Hydrolysiert man beide DNP-Aminosäuren zusammen mit 0,5 g DNP-Kollagen, so beträgt der Verlust an beiden DNP-Aminosäuren etwa 15 % (Abb. 2).

Bei der Hydrolyse von DNP-Kollagen gemeinsam mit DNP-Asp und DNP-Gly wäre eigentlich eine Ausbeute von etwa 90 % zu erwarten (Mittel aus 86,9 und 96,4). Der Wert von 85 % konnte jedoch mehrfach bestätigt werden. Die auf das DNP-Kollagen entfallenden Mengen an DNP-Asp und DNP-Gly wurden, nachdem sie bestimmt worden waren, vor Berechnung der Ausbeuten für die in Tab. 5 aufgeführten Werte in Abzug gebracht.

c) Säulenchromatographie der DNP-Aminosäuren an Polyamid

Die im Verlauf dieser Arbeit zur quantitativen Bestimmung von Amino-Endgruppen an DNP-Kollagen verwendete Methode gründet sich auf die von Hörmann und v. Portatius (81) erarbeitete säulenchromatographische Trennung aromatischer Nitroverbindungen an Polyamid. Die Autoren hatten das chromatographische Verhalten verschiedener 2,4 - Dinitrophenylaminosäuren, - Peptide und anderer aromatischer Nitroverbindungen an Polycaprolactam in Dimethylformamid (DMFA), Eisessig, Wasser und Äthanol enthaltenden Lösungsmittelsystemen untersucht. Hierbei ergab sich eine Affinität aromatischer Nitroverbindungen zu Polyamid, die auf einer Antibasen-Basen-Wechselwirkung der Nitrogruppen mit den freien Amino-Endgruppen des Polymeren beruht und der Methode in gewissem Sinne den Charakter einer Ionenaustauschchromatographie gibt. Von den Autoren

waren u. a. zwei Lösungsmittelsysteme ausgearbeitet worden, die aus den gleichen Komponenten bestehen und sich nur durch deren mengenmässige Zusammensetzung unterscheiden. Es handelt sich dabei um ein weniger stark und ein stark eluierendes Lösungsmittelgemisch, dessen stärker eluierende Wirkung auf einem höheren Gehalt an DMFA und Eisessig beruht.

Lösungsmittelgemisch I (mittlere Elutionswirkung)

DMFA, Eisessig, Wasser, Äthanol

5 : 10 : 30 : 20

Lösungsmittelgemisch II (starke Elutionswirkung)

DMFA, Eisessig, Wasser, Äthanol

8 : 15 : 25 : 20

Das Lösungsmittelgemisch I kam im Verlauf dieser Arbeit zur Bestimmung der α -Amino-Endgruppen von Kollagen (Mono-DNP-Aminosäuren) zur Anwendung, während das Lösungsmittelgemisch II bei den in Teil VI 2. beschriebenen Trennungen von fester an Polyamid haftenden Bis-DNP-Aminosäuren verwendet wurde.

Zur Durchführung der säulenchromatographischen Trennung und quantitativen Endgruppenbestimmung, wurden die in wenig Äthanol (0,5 - 1,0 ml) gelösten DNP-Aminosäuren auf die Säulen aufgetragen und mit Lösungsmittelgemisch I eluiert. Nach Auffangen der Fraktionen im Fraktionssammler wurden die Extinktionen bei 366 m μ im Eppendorf-Kolorimeter (Medeor) gemessen. Zu diesem Zweck mussten zunächst die Extinktionskoeffizienten sowie die R_f-Werte der einzelnen Komponenten überprüft werden. Sie sind in Tab. 6 wiedergegeben.

Da sich bei der Hydrolyse relativ grosse Mengen an Dinitroanilin (DNP-NH₂) bilden, siehe Abb. 4 u. 6. und wie bereits erwähnt, eine quantitative Entfernung von Dinitrophenol (DNP-OH) nicht möglich war, mussten die Endgruppen neben DNP-NH₂ und DNP-OH bestimmt werden. Dies gelang auf Grund der Tatsache, dass, wie Tab. 6 zeigt, die R_f-Werte der auftretenden Komponenten weit genug auseinander liegen, um eine scharfe Trennung der einzelnen Fraktionen zu ermöglichen.

Tab. 6

Molare Extinktionskoeffizienten (bei 366m μ) und Rf-Werte (an Ultramid BM) von DNP-Derivaten

Säulenlänge 41 cm, $\varnothing$ 9 mm;

Verbindung	Elutionsmittel	ϵ Mol ($1 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	Rf-Wert
DNP-NH ₂	Lösungsmittelgem. I	$0,870 \cdot 10^4$	0,47
DNP-OH	DMFA: 5 Eisessig: 10	$0,128 \cdot 10^4$	0,33
DNP-Asp	Wasser: 30 Äthanol: 20	$1,182 \cdot 10^4$	0,24
DNP-Gly		$1,065 \cdot 10^4$	0,23
DNP-NH ₂	Eisessig	$0,680 \cdot 10^4$	
DNP-OH		$0,139 \cdot 10^4$	
DNP-NH ₂	ges. Bicarbonat	$0,891 \cdot 10^4$	
DNP-OH		$1,243 \cdot 10^4$	

Abb. 3 zeigt eine Trennung von DNP-NH₂ und DNP-OH, den beiden, in allen DNP-Protein-Hydrolysaten enthaltenen, schwer abtrennbaren Begleitsubstanzen. Die Abb. zeigt, dass die beiden DNP-Verbindungen im Lösungsmittelgem. I relativ rasch wandern. DNP-NH₂ läuft fast mit der Lösungsmittelfront.

Abb. 3

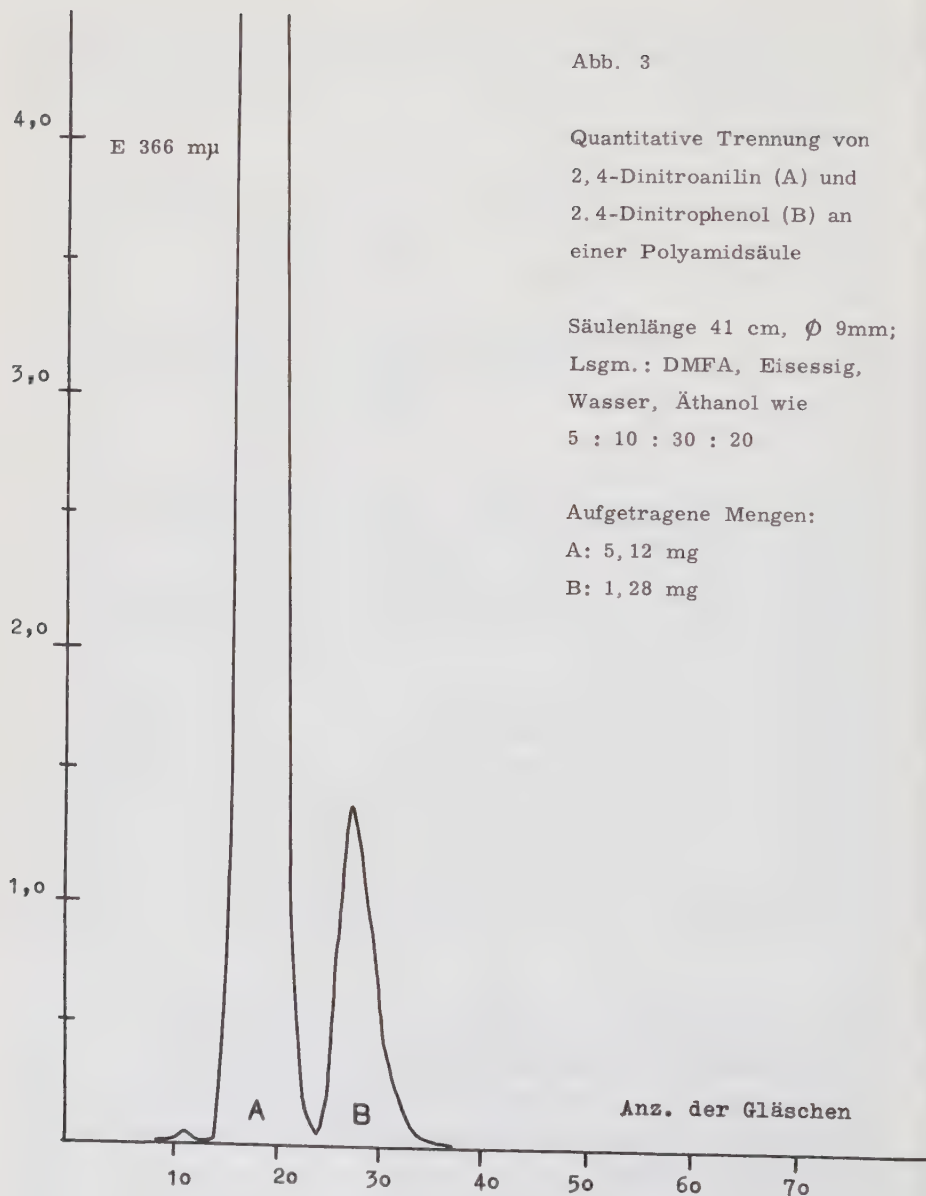
Quantitative Trennung von
2,4-Dinitroanilin (A) und
2,4-Dinitrophenol (B) an
einer Polyamidsäule

Säulenlänge 41 cm, ϕ 9mm;
Lsgm.: DMFA, Eisessig,
Wasser, Äthanol wie
5 : 10 : 30 : 20

Aufgetragene Mengen:

A: 5,12 mg

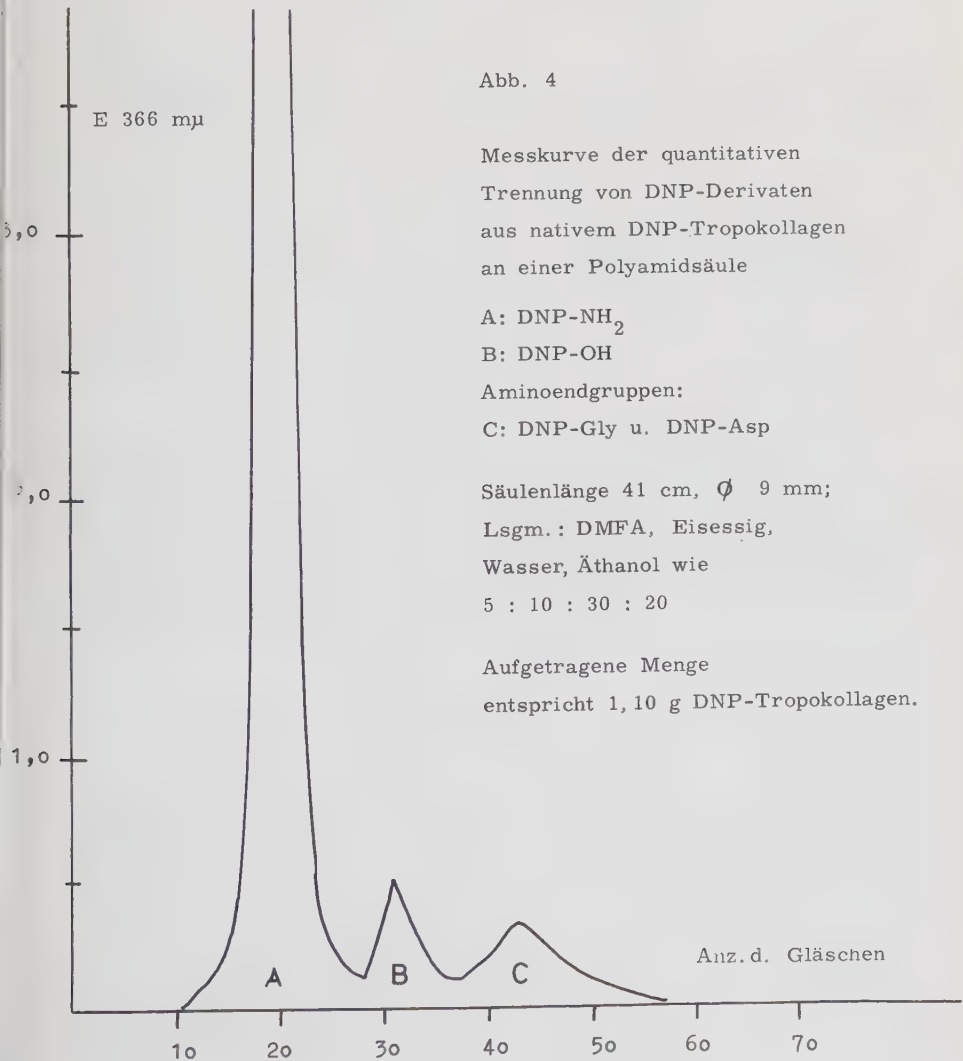
B: 1,28 mg



2. Ergebnisse

a) α -Aminoendgruppen von nativem und denaturiertem Tropokollagen und Kollagen

Abb. 4 zeigt als typisches Beispiel die säulenchromatographische Auftrennung der DNP-Verbindungen des Hydrolysates von nativem DNP-Tropokollagen. Man erhält eine scharfe Trennung in 3 Gipfel.



A wurde dünnschichtchromatographisch als Dinitroanilin, B als Dinitrophenol identifiziert. In Fraktion C fanden sich DNP-Asparaginsäure und DNP-Glycin. Diese stellen offensichtlich die Endgruppen dar.

Zur quantitativen Bestimmung der α -Aminoendgruppen mussten die auftretenden Mengen an DNP-Gly und DNP-Asp im Eluat gemeinsam bestimmt werden, da sie, wie aus Tab. 6 sowie aus Abb. 2 hervorgeht, an Polyamid einen ähnlichen Rf-Wert besitzen. Zur Berechnung der Ergebnisse wurde ein Extinktionskoeffizient verwendet, der das Mittel aus den Extinktionskoeffizienten von DNP-Gly und DNP-Asp (Tab. 6) darstellt.

Abb. 5 zeigt als typisches Beispiel die Auftrennung der gesamten DNP-Verbindungen des Hydrolysates von nativem DNP-Tropokollagen durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie. Man erkennt deutlich, dass neben den beschriebenen DNP-Verbindungen keine weiteren Komponenten nachweisbar sind.

Die in Tab. 7 zusammengefassten Werte enthalten die Ergebnisse der α -Amino-Endgruppenbestimmungen an nativem und denaturiertem Tropokollagen und Kollagen. Der Anteil des Glycins betrug in allen Fällen zwischen 68 und 94% der gesamten Endgruppen. An Spuren wurde lediglich bei nativem Kollagen Alanin nachgewiesen. Neben den Endgruppen wurden die gleichzeitig auftretenden, stark schwankenden Mengen an DNP-NH₂ und DNP-OH angeführt.

Abb. 5

Trennung und Identifizierung der

α -Aminoendgruppen von nativem
Tropokollagen durch zweidimensionale
Dünnschichtchromatographie auf Kiesel-
gel (DNP-Methode)

Lösungsmittel:

1. Dimension:

Toluol: Pyridin:

Äthylenchlorhydrin:

0,8n Ammoniak wie

100 : 30 : 60 : 60

2. Dimension:

Benzol: Pyridin:

Eisessig wie

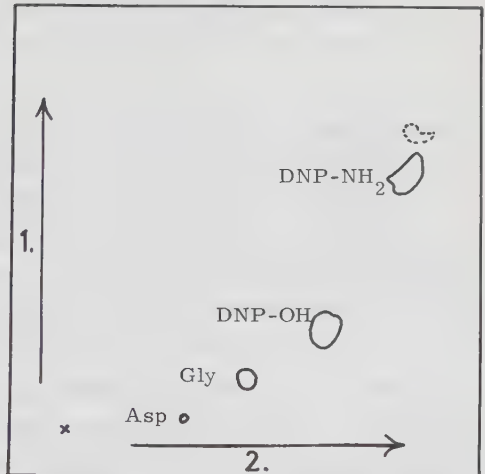
80 : 20 : 20

Kieselgel G nach

Stahl

(Aufsteigend)

UV-Photoprintkopie



Tab. 7

Bestimmung N-terminaler Aminosäuren an Kollagen

Mol/ 1.000 Mol AS

Material	DNP-NH ₂	DNP-OH	DNP-Aminosäuren ⁺			
			Gesamt- menge	davon Asp	% Gly	Spuren
Kollagen nat.	0,92	0,93	0,13	8	92	Ala
Kollagen denat.	2,74	1,15	0,12	32	68	-
Tropokollagen nat.	0,79	0,46	0,08	6	94	-
Tropokollagen denat.	3,73	9,21	0,17	19	81	-

⁺ Die Errechnung der Werte für DNP-Gly und DNP-Asp geschah unter Verwendung eines aus Tab. 5 entnommenen, den durch die Hydrolyse bewirkten Verlust von 14,2% (Ausbeute = 85,8%) berücksichtigenden Korrekturfaktors.

Der prozentuale Anteil an DNP-Gly und DNP-Asp wurde durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel nach der Methode von Brenner, Niederwieser und Pataki (82) bestimmt (Abb. 5). Nach der Elution der Flecken und Messung der Extinktionen durch Vergleich mit mitgelaufenen Proben von bekanntem Gehalt an DNP-Gly und DNP-Asp, konnte das Verhältnis DNP-Gly: DNP-Asp berechnet werden.

b) Quantitative Bestimmung der α -Aminoendgruppe des Rinderserum-Albumins (als Kontrollversuch)

Zur Kontrolle der angewandten Methode wurde an einem gut untersuchten Protein, und zwar an Rinderserum-Albumin, auf gleiche Weise eine Endgruppenbestimmung durchgeführt.

Rinderserum-Albumin besteht aus einer einzigen Polypeptidkette mit einer freien α -Amino- und einer freien α -Carboxylgruppe. Am Aminoende steht beim Serumalbumin des Rindes (wie auch bei dem des Menschen, Pferdes und Schweines) Asparaginsäure (83). Das Molekulargewicht beträgt 65.000 (84).

Das Rinderserum-Albumin wurde nach dem beschriebenen Verfahren durch Lösen in 2,5 molarem NaClO_4 denaturiert. Danach wurde in der auf pH 9,0 gebrachten Lösung, welche 4% NaHCO_3 enthielt, dinitrophenyliert. Anschliessend folgte Extraktion des überschüssigen DNFB, Dialyse gegen Wasser zur Entfernung der Salze, Gefriertrocknung und Extraktion des DNP-OH durch Äthanol. Die Hydrolyse des DNP-Rinderserum-Albumins musste jedoch unter weitaus schärferen Bedingungen durchgeführt werden, als sie beim DNP-Kollagen zur Anwendung kamen, da sich herausstellte, dass das DNP-Serumalbumin anders als DNP-Kollagen, nur durch starke, siedende Salzsäure allmählich gelöst wird. Demnach wurde das Produkt in der 1. Stufe 4 h in 8n HCl hydrolysiert. Nach Extraktion wurde die wässrige Phase auf 10n an HCl gebracht und erneut 4 h am Rückfluss gekocht.

Abb. 6 zeigt die Messkurve der quantitativen Trennung von DNP-Derivaten aus DNP-Rinderserum-Albumin an einer Polyamidsäule. Auch in diesem Falle traten relativ grosse Mengen an DNP-NH_2 und DNP-OH auf. Abb 7 zeigt eine Auftrennung in die Komponenten durch eindimensionale Dünnschichtchromatographie mit den entsprechenden Vergleichssubstanzen.

Auf Grund des Molekulargewichtes von 65.000 errechnet sich, bei einem Mol Asparaginsäure als Amino-Endgruppe, ein Gehalt von 0,015 mMol Asp

pro Gramm Serumalbumin bzw. von 1,5 Mol Asp pro 1.000 Mol Aminosäuren. Die Endgruppenbestimmung ergab einen Gehalt von 0,0095 mMol Asp pro Gramm Protein. Das entspricht einer Ausbeute von 65% der Theorie, was bei den ausserordentlich verschärften Hydrolysebedingungen, die zu relativ hohen Verlusten an DNP-Asp führen, als durchaus befriedigendes Ergebnis bezeichnet werden kann.

Das Resultat der Analyse ist in Tab. 8 noch einmal übersichtlich dargestellt.

Tab. 8

Ergebnis der α -Amino-Endgruppenbestimmung an Rinderserum-Albumin

Mol. Gew. 65.000

	mMol Asp/Gramm	Mol Asp/1.000Mol As	Ausbeute %
ber.	0,015	1,50	100
gef.	0,0095	0,95	65

Abb. 6

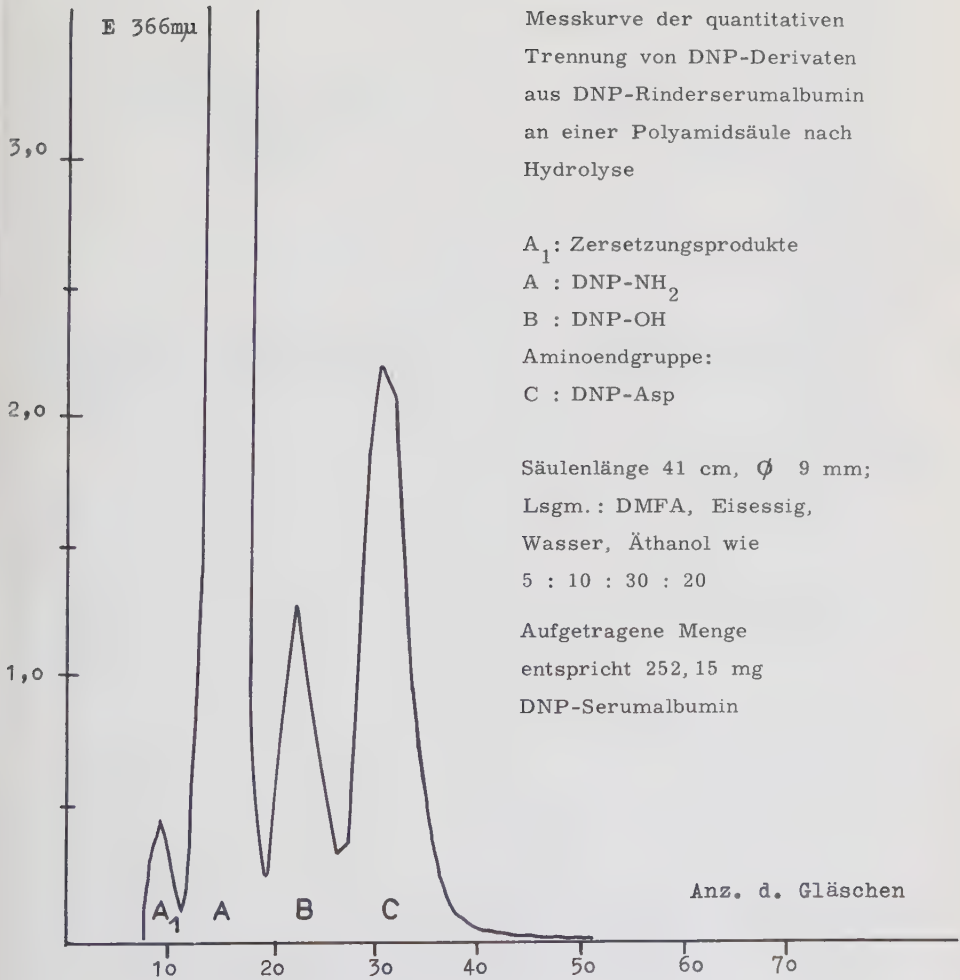


Abb. 7

Trennung und Identifizierung
der α -Amino-Endgruppe von
Rinderserumalbumin durch ein-
dimensionale Dünnschicht-
chromatographie auf Kieselgel
(DNP-Methode)

Als Vergleichssubstanzen
aufgetragen:

I DNP-Asp,

II DNP-OH,

III DNP-NH₂,

IV DNP-Rinderserumalbumin
nach Hydrolyse

Lösungsmittel:

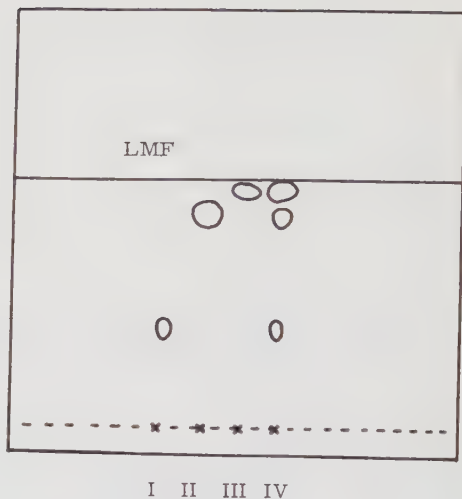
Benzol: Pyridin: Eisessig

80 : 20 : 20

Kieselgel G nach Stahl

(Aufsteigend)

UV-Photoprintkopie



Diskussion der Ergebnisse

a) Zur Methode

Im folgenden werden die Verfeinerungen des in dieser Arbeit angewendeten Verfahrens zur Bestimmung von α -Aminoendgruppen gegenüber den bisher gebräuchlichen Methoden zusammengefasst:

1. In früheren Untersuchungen hatten verschiedene Autoren bereits festgestellt, dass in Kollagen keine freien Aminoendgruppen nachweisbar sind (38, 48, 49, 85). Diese negativen Ergebnisse könnten möglicherweise damit erklärt werden, dass die Endgruppen im nativen Protein der Umsetzung mit DNFB nicht zugänglich sind. Auch bei den Bestimmungen an denaturiertem Tropokollagen waren gegen eine Renaturierung während der Umsetzung von keinem Autor Massnahmen ergriffen worden. In dieser Arbeit wurde eine Renaturierung während der Reaktion durch Dinitrophenylierung in 2,5 m NaClO_4 -Lösung ausgeschlossen und die Voraussetzung für eine quantitative Umsetzung gegeben. Auf gleiche Weise konnte, wie in Teil II berichtet (vergl. Tab. 4) eine vollständige Substitution der ϵ -Aminogruppen erreicht werden, die von einigen Autoren offensichtlich aus dem gleichen Grunde als nicht quantitativ erfassbar beschrieben wurden (38, 39, 86). Tropokollagen konnte nach dieser Methode ausserdem in homogener Lösung umgesetzt werden, was ebenfalls zu einer raschen und vollständigeren Substitution beitrug.

2. Eine weitere Fehlerquelle bei Aminoendgruppenbestimmungen besteht in den Verlusten, die bei der Hydrolyse von DNP-Verbindungen auftreten. Von DNP-Asp und DNP-Gly z.B. wurden nach 18-stündiger Hydrolyse mit 6n HCl 60 bzw. 16% wiedergewonnen (46b, 85). Um diese Verluste möglichst klein zu halten, wurde in der vorliegenden Arbeit das DNP-Protein in zwei Stufen je 4 h hydrolysiert, wobei die Hauptmenge der abzuspal tenden DNP-Aminosäuren bereits nach kurzen Hydrolysenzeiten abgetrennt und lediglich der verbliebene noch nicht hydrolysierte Rest längere Zeit der Säureeinwirkung ausgesetzt wurde. Die Ausbeuten an DNP-Gly

und DNP-Asp betrugen bei den Vorversuchen 64 bzw. 79%. Hydrolysiert man - wie es den tatsächlichen Verhältnissen besser entspricht - unter Zusatz von DNP-Kollagen, so betragen die Ausbeuten sogar 87 bzw. 96%. (Vergl. Tafel 5)

Dass unter diesen Bedingungen die DNP-Aminosäuren von DNP-Kollagen quantitativ abgespalten werden, wurde in Teil V, Abb. 8 an einem modifizierten Kollagenpräparat gezeigt, das den höchsten in dieser Arbeit gefundenen Gehalt an Aminoendgruppen aufweist. 96% aller vorhandenen DNP-Aminosäuren wurden bereits während der ersten Hydrolysestufe freigesetzt; nach der zweiten Stufe wurde nur noch ein Rest von 4% des gesamten Endgruppengehaltes isoliert.

3. Die Empfindlichkeit der quantitativen Bestimmung der abgespaltenen DNP-Aminosäuren, DNP-Asp und DNP-Gly, die neben Dinitrophenol und Dinitranilin vorliegen, wurde durch Chromatographie an Polyamid erheblich verbessert. Bei dieser Trennung wandern die DNP-Verbindungen als schmale Banden verhältnismässig rasch durch die Säule ohne sich zu verschmieren, wie dies bei Chromatographie an Kieselgel der Fall ist (87, 88, 80c). Die Trennung erlaubt sichere Bestimmungen von 0,5 μ Mol DNP-Glycin bzw. DNP-Asparaginsäure pro Gramm Kollagen. Dies entspricht einer Menge von 0,05 Mol Endgruppen pro 1.000 Mol Aminosäuren bzw. 0,12 - 0,15 mg DNP-Gly bzw. DNP-Asp (vergl. Tab. 7). Zur Identifizierung der aufgetrennten DNP-Verbindungen und zur Kontrolle von etwa vorhandenen Begleitkomponenten bewährte sich als empfindliche und rasch durchführbare Methode eine dünnschichtchromatographische Analyse nach der Methode von Brenner und Niederwieser (82).

Abschliessend ist zu bemerken, dass die Methode und damit auch die Ergebnisse der an Kollagen durchgeführten Endgruppenbestimmungen durch einen an Rinder Serumalbumin vorgenommenen Kontrollversuch bestätigt werden konnten (Tab. 8, Abb. 6 und 7).

b) Die Ergebnisse der α -Amino-Endgruppenbestimmungen an Kollagen

Die in Tab. 7 zusammengefassten Ergebnisse der Endgruppenbestimmungen an Tropokollagen und Kollagen zeigen, dass Kollagen weniger als 0,2 Mol

α -Aminoendgruppen pro 1.000 Mol AS, also praktisch keine freien Aminoendgruppen besitzt. Damit konnten die Resultate der Arbeiten von Graßmann und Hörmann (48), Bowes und Moss (38), Joseph und Bose (49), sowie eine Reihe anderer Autoren (85) bestätigt werden. Die von den zuletzt genannten Autoren gefundenen Werte bewegen sich in der gleichen Größenordnung von 0,05 - 0,2 Mol/1.000 Mol AS. Bei einem Molekulargewicht des Kollagens von 360.000 sollte unter der Voraussetzung, dass jede der 3 Ketten der Dreierspirale des Tropokollagenmoleküls jeweils eine Aminoendgruppe trägt, auf etwa 1.000 Mol AS 1 Mol Endgruppen entfallen. Dieser Wert wird jedoch nicht annähernd erreicht. Auch die Annahme, dass eine Kette eine freie α -Aminoendgruppe trägt, findet in den Ergebnissen keine Stütze. Bei den geringen Mengen an nachweisbaren Endgruppen kann es sich daher nur um nichtkollagene Begleitproteine sowie um die Produkte unspezifischer, im Verlauf der Darstellung und Aufarbeitung entstandener Spaltungen handeln.

Der in der Arbeit von Deasy (56) beschriebene Nachweis einer etwa einem Mol Endgruppen pro 1.000 Mol AS entsprechenden Menge an Gly, Asp und Ser ist darauf zurückzuführen, dass die nach Hydrolyse des DNP-Kollagens und Extraktion erhaltenen ätherlöslichen Produkte ohne Trennung summarisch ausgewogen wurden. Da das DNP-Kollagen zudem nach der Dinitrophenylierung nicht extrahiert wurde, muss der weitaus grösste Teil der ausgewogenen DNP-Verbindungen aus DNP-OH und DNP-NH₂ bestanden haben.

Da auch in der darauf folgenden Trennung der DNP-Derivate an Kieselgel-Celite die Komponenten nicht quantitativ sondern nur qualitativ bestimmt wurden, ist das Ergebnis dieser allen anderen Untersuchungen widersprechenden Arbeit nicht genügend gesichert.

Die Frage, wodurch die Aminoendgruppen des Kollagens der Dinitrophenylierung und damit dem Nachweis entzogen werden, ist noch nicht geklärt. In den letzten Jahren wurde festgestellt, dass sich auch an zahlreichen anderen Proteinen keine freien Aminoendgruppen nachweisen lassen (52, 53). Inzwischen wurde jedoch bekannt, dass die Aminoend-

gruppe des Cytochroms C aus Pferdeherz (54), der Proteinkomponente des Tabakmosaikvirus (55) und wie es scheint auch die des Ovalbumins (52) und anderer Proteine acetyliert ist. In der B-Kette des Fibrinogens wurde N-terminal Pyrrolidoncarbonsäure nachgewiesen (104), so dass hier gleichfalls keine freie Aminoendgruppe vorliegt. Neben diesen Möglichkeiten ist beim Kollagen noch eine Maskierung durch Mucopolysaccharide zu erwägen.

IV. α -Aminoendgruppenbestimmung an Kollagen nach Einwirkung von Pepsin sowie Perjodat-Harnstoff

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die ausgearbeitete und in Teil III beschriebene Methode zur Aminoendgruppenbestimmung auf eine Reihe in verschiedener Weise modifizierter Kollagenproben angewandt. Zunächst war die Frage zu klären, ob bei der Behandlung von Kollagen mit Pepsin, sowie mit Perjodat-Harnstoff Endgruppen entstehen. Der Untersuchung dieser Frage kommt, wie man aus den Ausführungen auf Seite 7 und Seite 9 entnehmen kann, eine grosse Bedeutung bei der Beurteilung von Schlussfolgerungen zu, die aus den Ergebnissen der Reaktion des Kollagens mit Pepsin und Perjodat gezogen werden.

1. α -Aminoendgruppenbestimmung an Kälberkollagen nach Einwirkung von Pepsin

Das Kollagen jüngerer Tiere, z.B. Kälberkollagen, lässt sich durch Pepsin bei niedriger Temperatur verhältnismässig rasch und vollständig in nativer Form in Lösung bringen (42). Daher wurde zur Durchführung von Endgruppenbestimmungen Kälberkollagen in 0,02n HCl 70 h lang bei 20° C und einem Enzym-Substratverhältnis von 1 : 500 mit Pepsin behandelt. Das zugesetzte Pepsin, die nicht kollagenen Begleitsubstanzen, sowie die durch Pepsineinwirkung abgespaltenen Teloptide mussten nun möglichst quantitativ entfernt werden, um eine exakte, nur die N-terminalen Aminosäuren des Tropokollagenmoleküls

erfassende Endgruppenbestimmung zu gewährleisten. Zu diesem Zweck wurde die klare Lösung nach gründlichem Zentrifugieren gegen 0,02 m NaHPO_4 -Puffer dialysiert. Das ausgefällte Material wurde zur weiteren Reinigung in Citratpuffer (pH 3,3) gelöst und nach gründlichem Zentrifugieren erneut durch Dialyse gegen 0,02 m Phosphatpuffer ausgefällt. Das derart vorgereinigte Material wurde nun noch zweimal in gleicher Weise durch Lösen in Citratpuffer, gründliches Zentrifugieren und erneutes Fällen durch Dialyse gegen verd. Phosphatpuffer umkristallisiert. Anschliessend an jede der drei Reinigungsstufen wurde nach erfolgter Umsetzung mit DNFB in 2,5 m NaClO_4 -Lösung, jeweils eine Endgruppenbestimmung durchgeführt. Dieser Versuch sollte zeigen, ob durch die stufenweise Reinigung des Materials ein konstanter Endwert erreicht werden kann. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 9 wiedergegeben. Wie man aus Tab. 9 entnehmen kann, lassen sich in pepsingelöstem Kälberkollagen Endgruppen nachweisen, die gegenüber nativem Tropokollagen deutlich vermehrt sind. Die Menge beträgt nach mehrmaligem Umdialysieren des gelösten Kollagens etwa 0,3 Mol/1.000 Mol Aminosäuren. Bei den letzten Reinigungsoperationen hatten die Endgruppen nur mehr geringfügig abgenommen, so dass die angegebene Menge als konstant angesehen werden kann.

Tab. 9

Aminoendgruppen von Tropokollagen und pepsingelöstem Kälberkollagen;
Kollagen: Enzym = 500 : 1 in 0,02 n HCl, 70 h bei 20° C;

	Asp + Gly Mol/1.000 Mol AS	% Asp	% Gly	Spuren
Tropokollagen	0,08	6	94	--
Pepsingel. Kälberkollagen				
1x umkrist.	0,45	26	74	
2x umkrist.	0,37	29	71	Glu, Ser,
3x umkrist.	0,31	38	62	Leu

2. α -Amino-Endgruppenbestimmung an Rinderkollagen nach Auflösung durch Perjodat-Harnstoff

Hörmann und Klenk (19, 26) haben die Vorstellung entwickelt, dass die Hexosen des Kollagens an den Quervernetzungen beteiligt sind. Die Grundlage dafür bietet das Verhalten von Kollagen bei der Einwirkung von Perjodat.

Im Anschluss an diese Untersuchungen sollte geprüft werden, ob eine Einwirkung von Perjodat in Gegenwart von 8 m Harnstoff - Reaktionsbedingungen unter denen reifes Kollagen in Lösung geht - ebenfalls zur Spaltung der Peptidkette führt.

Zu diesem Zweck wurde Rinderkollagen in 10%-iger Essigsäure in Gegenwart von 8m Harnstoff 14 Tage lang bei 20° C mit 0,02m Perjodat behandelt. Nach Zerstörung des überschüssigen Oxydationsmittels durch Zusatz von Na₂SO₃, wurde das gelöste Material durch Dialyse von Salz befreit, anschliessend gefriergetrocknet, in Gegenwart von 2,5 m NaClO₄ dinitrophenyliert und zur Endgruppenbestimmung eingesetzt.

Die Ergebnisse des Versuchs sind in Tab. 10 zusammengestellt. Das gelöste Kollagen enthält nur eine sehr geringe Menge an Endgruppen. Beim Angriff von Perjodat ist somit nicht oder nur in sehr geringem Umfang eine Spaltung von Peptidbindungen erfolgt.

Tab. 10

Aminoendgruppen von Rinderkollagen nach Auflösung durch Perjodat-Harnstoff.

Reaktionsbedingungen: 0,02m Perjodat + 8m Harnstoff in 10% Essigsäure, 14 Tage bei 20° C;

Asp + Gly Mol/1.000 Mol AS	% Asp	% Gly	Spuren
0,27	22	78	Glu, Ser, Ala

3. Diskussion der Ergebnisse

In Übereinstimmung mit den Vorstellungen von F.O.Schmitt (44) und Nishihara (41) zeigen die in Tab. 9 zusammengefassten Ergebnisse, dass pepsingelöstes Kälberkollagen Aminoendgruppen besitzt, während an unbehandeltem Tropokollagen praktisch keine nachgewiesen werden konnten. Die Menge an auftretenden Endgruppen ist gering und beträgt etwa 0,3 Mol/1.000 Mol AS, was bedeuten würde, dass nur eine der drei Peptidketten des Tropokollagenmoleküls durch Pepsineinwirkung am Aminoende geschädigt wurde. Nach F.O.Schmitt (44) sollen diese proteaselabilen, über die Enden der Dreierspirale des Tropokollagenmoleküls hinausragenden Telo peptide auf noch ungeklärte Weise die Polymerisation der Tropokollagenmoleküle zu Fibrillen des nativen Typs erleichtern. Untersuchungen von Hörmann und Hafter (89) ergaben, dass mit steigender Pepsinkonzentration grössere Mengen an Telo peptiden abgespalten werden. Die Werte in Tab. 9 zeigen, dass sich bei mehrfachem Reinigen des Materials durch Umfällen der Endgruppengehalt nur unwesentlich verringert. Die kleinen auftretenden Differenzen werden durch eine stufenweise Eliminierung niedrigmolekularer, dialysierbarer Peptide in befriedigender Weise erklärt. Die Endgruppenbestimmungen an Kollagen nach Auflösung durch Perjodat-Harnstoff ergaben einen sehr geringen Gehalt an freien α -Aminogruppen (Tab. 10). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Untersuchungen von Hörmann und Fries (35a), die weder eine Freisetzung zusätzlicher Aminoendgruppen noch die Abspaltung dialysierbarer Eiweissbruchstücke durch Einwirkung von Perjodat feststellen konnten. Da die Endgruppenbestimmungen in der zitierten Arbeit nach einer relativ groben Methode (von Slyke) durchgeführt wurden, bedurften sie einer Überprüfung durch ein auch sehr kleine Mengen genau erfassendes Verfahren.

Mit Sicherheit kann festgestellt werden, dass ein Aufbrechen der Peptidkette des Tropokollagenmoleküls, wie es von Graßmann und Kühn (34) im Falle der Einwirkung von Phenyljodosoacetat beobachtet wurde, durch Behandlung mit Perjodat-Harnstoff nicht erfolgt. Die Autoren hatten eine mittlere Kettenlänge von 21 - 25 Aminosäuren ermittelt!

Bei der Beurteilung der kleinen, dennoch nachweisbaren Menge an Endgruppen nach Behandlung mit Perjodat-Harnstoff muss berücksichtigt werden, dass bei 14-tägigem Stehen bei Zimmertemp. in 10%-iger Essigsäure mit geringfügigen unspezifischen Spaltungen durch Hydrolyse zu rechnen ist.

V. Untersuchungen an Kollagen nach Behandlung mit Hydroxylamin

Neben der in Kapitel IV untersuchten Umsetzung von Kollagen mit Pepsin und Perjodat sollten mit der Methode der Endgruppenbestimmung auch die durch Einwirkung von Hydroxylamin auf Kollagen hervorgerufenen Veränderungen studiert werden.

Erste Versuche von Gallop (25) hatten ergeben, dass Tropokollagen esterartige Bindungen enthält, die durch Einwirkung von Hydroxylamin zu Hydroxamsäuren umgesetzt werden können. Gallop hatte bei seinen Untersuchungen hitzedenaturiertes Tropokollagen verwendet.

Nach Arbeiten von Hörmann und Klenk (19, 26) lässt sich reifes Kollagen durch gleichzeitige Einwirkung von Hydroxylamin und Wasserstoffbrücken sprengenden Agentien wie LiCl rasch und vollständig in Lösung bringen, während mit Hydroxylamin vorbehandeltes Material durch nachfolgende Einwirkung von LiCl sehr langsam und nur teilweise gelöst wird. Es handelt sich hierbei neben der Einwirkung von Pepsin und Perjodat um ein drittes Verfahren, durch welches Kollagen hochmolekular in Lösung gebracht werden kann.

Diese Ergebnisse wurden damit gedeutet, dass Hydroxylamin die Quervernetzungen des Kollagens spaltet (siehe dazu S. 5). In Fortführung dieser Untersuchungen sollte durch Sedimentationsversuche in der Ultrazentrifuge sowie durch Endgruppenbestimmungen festgestellt werden, ob und in welchem Umfang die Einwirkung von Hydroxylamin in Abwesenheit und in Gegenwart von Wasserstoffbrückensprengern zur Spaltung von Peptidketten führt.

1. Die Einwirkung von Hydroxylamin auf Kollagen in Gegenwart von Lithiumchlorid

Die bisherigen Versuche von Gallop, von Hörmann und Klenk hatten sich vor allem mit der Einwirkung von Hydroxylamin auf denaturiertes Kollagen befasst. Gallop, der hitzedenaturiertes Tropokollagen als Substrat verwendet hatte, fand dabei eine Abnahme des Molekulargewichtes von 120.000 bzw. 240.000 auf etwa 25.000. Gleichzeitig bildeten sich etwa 6 Mol Hydroxamsäuren pro 1.000 Mol Aminosäuren. Von Hörmann und Klenk, die Hydroxylamin in Gegenwart von 4 m LiCl auf Tropokollagen und Kollagen einwirken liessen, lagen bisher noch keine Angaben über Molekulargewichte der Reaktionsprodukte vor. Die Menge der nach Reaktion mit Tropokollagen gefundenen Hydroxamsäuren (6,4 Mol/1.000 Mol Aminosäuren) stimmte mit den von Gallop (25) angegebenen Werten überein. Im Falle des Kollagens bildeten sich 10,4 Mol Hydroxamsäuren pro 1.000 Mol Aminosäuren. Der Unterschied wird auf die intermolekularen Quervernetzungen zurückgeführt. Im folgenden wurde Tropokollagen und reifes Kollagen nach der von Hörmann und Klenk erarbeiteten Methode durch 0,75 m NH_2OH und 4 m LiCl bei pH 9,55 und 37°C innerhalb von 7 bzw. 12 Stunden in Lösung gebracht. Nach Dialyse wurden die beiden Proben in der Ultrazentrifuge untersucht. Gleichzeitig wurden nach Dinitrophenylierung die Aminoendgruppen bestimmt. Die Versuche sollten erstens klären, ob und in welchem Umfang bei gleichzeitiger Einwirkung von NH_2OH und LiCl mit Kettenspaltungen zu rechnen ist; zweitens war festzustellen, ob die Menge an ermittelten Endgruppen mit den durch Sedimentationsversuche bestimmten Molekulargewichten übereinstimmt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 11 enthalten.

Die Tab. 11 zeigt, dass bei beiden Proben freie Aminoendgruppen feststellbar sind. Das LiCl/ NH_2OH -gelöste Kollagen enthält im Vergleich zu LiCl/ NH_2OH -behandeltem Tropokollagen etwa die doppelte Menge an Endgruppen. Gegenüber dem bis auf etwa 10.000 (und tiefer) abgesunkenen

Molekulargewicht treten jedoch noch viel zu wenig Endgruppen auf, wenn man voraussetzt, dass jede Spaltstelle innerhalb der α -Kette (Mol.Gew. 120.000) zu einer neuen Aminoendgruppe führen sollte. In diesem Falle wären etwa 10 Mol Endgruppen pro 1.000 Mol Aminosäuren zu erwarten. In der Diskussion sollen diese Ergebnisse ausführlicher behandelt werden.

Tab. 11

Aminoendgruppen und Molekulargewichte von Tropokollagen und Kollagen nach Auflösung durch $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{LiCl}$;

Versuchsbedingungen: 0,75 m NH_2OH /4m LiCl, pH 9,55, 37° C;

	Tropokollagen	Kollagen
Einwirkungszeit(h)	7	12
Aminoendgruppen Mol/1.000 Mol AS	1,73	3,90
davon Asp %	5	21
Gly %	95	79
Spuren	Glu, Ser, Ala	Glu, Ser, Ala
Mol. -Gew.	≈ 10.000	≤ 10.000

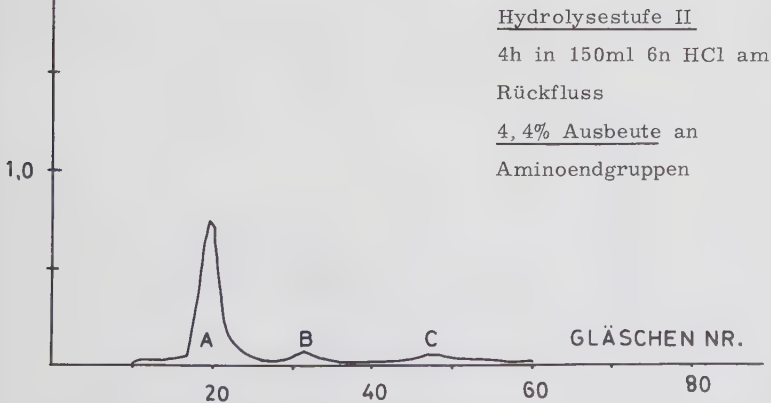
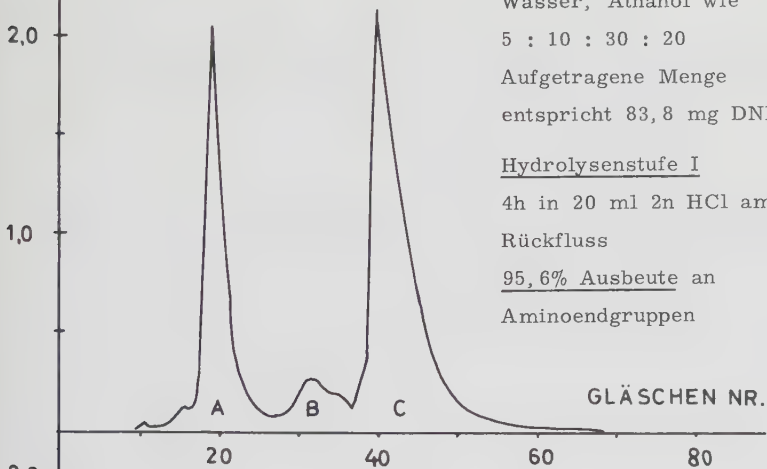
Abb. 8 zeigt die Trennung der DNP-Komponenten aus $\text{NH}_2\text{OH}/\text{LiCl}$ -behandeltem Kollagen nach Dinitrophenylierung und Hydrolyse an der Polyamidsäule.

Im Anschluss an die in Teil III 1. b) beschriebenen Untersuchungen zum Verlauf der Hydrolyse wurden hierbei bereits nach der ersten Hydrolysestufe die Endgruppe durch Säulenchromatographie bestimmt. Eine nachfolgende Bestimmung nach der zweiten Hydrolysestufe sollte zeigen, ob unter den angewandten Hydrolysebedingungen tatsächlich eine quantitative Abspaltung der dinitrophenylierten Aminoendgruppen erfolgt. Abb. 8 zeigt, dass dies annähernd der Fall ist. Nach vierstündiger Hydrolyse in 1nHCl

Abb. 8

Messkurve der quantitativen
Trennung von DNP-Derivaten
aus NH_2OH -LiCl-gelöstem,
dinitrophenyliertem Kollagen
an Polyamid

E 366 m μ

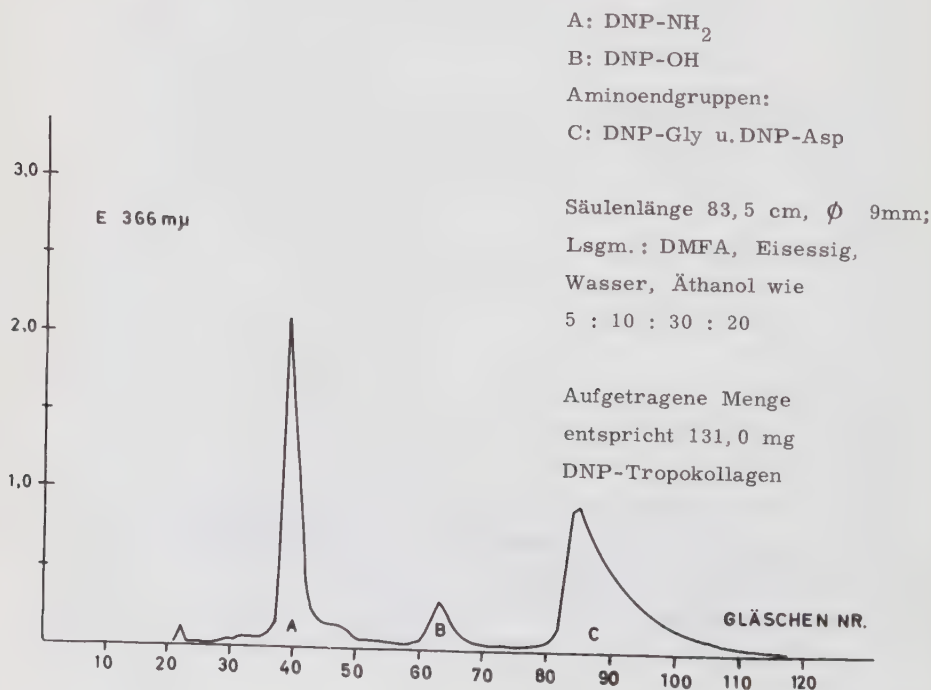


ist die Spaltung bereits nahezu vollständig. Man erhält 95,6% der als DNP-Verbindung vorliegenden Aminogruppen. Nach weiteren 4 Stunden Hydrolyse in 6 n HCl tritt nur noch ein Rest von 4,4 % Endgruppen auf. Zu dieser Untersuchung schien dieses Material, das den höchsten Gehalt an Aminoendgruppen aufweist, am besten geeignet zu sein (siehe hierzu auch Teil III 3. a)).

Abb. 9 zeigt die Auftrennung der DNP-Komponenten aus Tropokollagen, welches durch $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{LiCl}$ gelöst worden war, nach Dinitrophenylierung und Hydrolyse an einer langen Perlonsäule (83,5 cm).

Abb. 9

Messkurve der quantitativen Trennung von DNP-Derivaten aus $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{LiCl}$ -gelöstem, dinitrophenyliertem Tropokollagen an Polyamid;



2. Die Einwirkung von Hydroxylamin auf natives Tropokollagen

Die im vorangegangenen Abschnitt mitgeteilten Ergebnisse der Endgruppenbestimmung und der Sedimentationsversuche hatten gezeigt, dass die Peptidketten des Tropokollagens bei der Einwirkung von Hydroxylamin in Gegenwart von 4 molarem Lithiumchlorid, also unter Denaturierungsbedingungen, einen beträchtlichen Abbau erfahren. Diese Nebenreaktion war für die Klärung der Frage, ob es sich bei den Quervernetzungen des Kollagens um hydroxylaminspaltbare Bindungen handelt, sehr störend. Es wurde daher versucht, die Reaktionsbedingungen so weit abzuändern, dass eine Kettenspaltung möglichst vermieden wurde. Ein Erfolg in dieser Richtung war zu erwarten, wenn man Hydroxylamin auf natives Tropokollagen einwirken liess. In der nativen Proteinstruktur sollten die einzelnen Peptidbindungen wesentlich besser geschützt vorliegen als im denaturierten Molekül. Die erhaltenen Reaktionsprodukte sollten sowohl auf Endgruppen und Molekulargewicht der dissoziierten Untereinheiten als auch auf die Fähigkeit, in nativem Zustand Fibrillen und Segmente mit elektronenmikroskopischer Querstreifung zu bilden, untersucht werden.

Bei der Bearbeitung der Fragestellung ergab sich, dass Einzelheiten der Methodik das Molekulargewicht der Reaktionsprodukte sehr stark beeinflussten. In den ersten Versuchen wurde nach der sogleich zu beschreibenden Methode A verfahren. Bei dieser Arbeitsweise wurde noch ein stärkerer Abbau der Kollagenketten beobachtet. Bei der später verwendeten Methode B war ein solcher nicht mehr oder nicht mehr in wesentlichem Umfang nachzuweisen.

Methode A:

Hierbei wurde festes Tropokollagen in feinfaseriger, gefriergetrocknete Form bei pH 9,55 und 20° C in 0,75 m NH_2OH allmählich gelöst. Die Einwirkungszeit betrug 24 Stunden. Anschliessend wurde eventuell ungelöst gebliebenes Material abzentrifugiert und das gelöste Tropokollagen durch Dialyse gegen Wasser wieder ausgefällt. 101,27 mg Tropokollagen hatten sich in einem typischen Versuch in 12 ccm Hydroxylaminlösung vollständig gelöst. Es wurde nach dem Ausfällen durch Dialyse zu 66% wiedergewonnen.

Methode B:

Nach diesem Verfahren wurde in verd. Essigsäure gelöstes Tropokollagen in eine Hydroxylaminlösung eingerührt, wobei das Material sich nach vorübergehender Ausfällung rasch wieder löste. Das pH wurde auf 9,55 nachgestellt. Die Endkonzentration war gleichfalls 0,75 m an NH_2OH . Anschliessend wurde erst 24 Stunden gegen eine Hydroxylaminlösung gleicher Konzentration und gleichen pH-Wertes dialysiert; danach wurde das Tropokollagen durch Dialyse gegen Wasser mit einer Ausbeute von 90,5 % ausgefällt. Um unstrukturiertes, beim NH_2OH -Abbau entstehendes Material, welches, wie Vorversuche ergaben, die elektronenmikroskopischen Untersuchungen erheblich stört, zu entfernen, wurde an einem Teil der Proben eine Behandlung mit Trypsin in CaCl_2 -Lösung bei pH 8,0 vorgenommen. Das Enzym-Substrat-Verhältnis betrug 1 : 100.

Während der Inkubation veränderte sich die optische Drehung nur wenig; das bedeutet, dass kein wesentlicher Verlust an Tropokollagen zu verzeichnen war. Nach Dialyse gegen Wasser und Reinigen durch Umfällen aus Citratpuffer wurde das Produkt weiter untersucht.

In gleicher Weise wurde eine zweite Probe hergestellt, bei welcher zum Vergleich auf die Trypsinbehandlung verzichtet wurde.

a) Elektronenmikroskopische Untersuchungen: Bildung von Fibrillen und Segmenten (SLS) aus Hydroxylamin-gelöstem Tropokollagen

Bei der Arbeitsweise nach Methode A hatten Hörmann und Kühn bereits 1961 (19a) quergestreifte Fibrillen erhalten. Eine Abscheidung in Segmentform war damals jedoch noch nicht gelungen.

Aus beiden nach der Methode B mit Hydroxylamin behandelten Proben - einmal ohne und einmal mit Trypsineinwirkung - konnten in vorliegender Arbeit Fibrillen mit deutlicher elektronenmikroskopischer Querstreifung abgeschieden werden. Hierbei zeigte sich, dass die mit Trypsin behandelte Probe gut strukturierte Fibrillen in sehr hoher Ausbeute lieferte (EM-Aufnahme Nr. VI⁺), während die Untersuchung des nicht mit Trypsin behandelten Materials grosse Mengen unstrukturierter Materials ergab, in

⁺) EM-Aufnahmen siehe Teil VII, S. 98

welchem nur vereinzelt quergestreifte Fibrillen erkennbar waren. Durch Dialyse des in verd. Essigsäure gelösten, mit Trypsin behandelten Materials gegen eine 0,4%-ige Lösung von ATP bei verschiedenen pH-Werten gelang eine quantitative Abscheidung in Form von Segmenten (SLS). Dabei wurden zwei verschiedene Segmentformen beobachtet: Ein Ausfällen der Segmente bei pH 2,2 und 3,0 führt zu den bekannten asymmetrischen Segmenten, welche durch parallele Anordnung der Tropokollagenmoleküle zustande kommen (EM-Aufnahme Nr. VII). Fällt man jedoch bei pH 3,5, so erhält man eine bisher nicht beobachtete symmetrische Form der SLS, die offenbar durch antiparallele Zusammenlagerung der Tropokollageneinheiten entstehen (EM-Aufnahme Nr. VIII).

Eine Untersuchung der nicht mit Trypsin behandelten Probe nach Dialyse gegen ATP-Lösung ergab gut strukturierte in Richtung Faserachse längs zusammengelagerte, polymere Segmente (EM-Aufnahme Nr. IX). Diese Erscheinung lässt auf eine Assoziation der Tropokollagenmoleküle durch Zusammenlagerung an den Enden schliessen.

b) Untersuchungen in der Ultrazentrifuge

Tropokollagen, welches nach Methode A mit Hydroxylamin behandelt, nach Abscheidung in Faserform in 8 m Harnstoff denaturiert und anschliessend gegen Citratpuffer dialysiert worden war, sedimentierte bei 40° in der Ultrazentrifuge als etwas verbreiteter Gipfel mit $s_o = 2,22$ S. Aus dieser Sedimentationskonstante errechnet sich nach der Beziehung von Williams, Saunders u. Cicirelli (90), welche für ein ungeordnetes Knäuelmolekül gilt, ein Molekulargewicht von etwa 30.000. Da es sich unter diesen Umständen naturgemäss um ein Gemisch verschiedener Abbauprodukte handeln muss, ist der errechnete Wert als mittleres Molekulargewicht der Reaktionsprodukte anzusehen.

Das nach Methode B dargestellte Material verhielt sich dagegen in der Ultrazentrifuge ähnlich wie unbehandeltes Tropokollagen.

Bei den Untersuchungen dieser Proben, die mit Tropokollagen verglichen werden konnten, wurde auf die Ermittlung der Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentation und somit auch auf die Bestimmung der jeweiligen s_o -Werte verzichtet, um die Anzahl der Sedimentationsläufe einzuschränken. Um die

Ergebnisse trotzdem in Bezug auf Sedimentationskonstanten und Mengenverhältnis der Fraktionen mit unbehandeltem Tropokollagen in Beziehung setzen zu können, wurden die Sedimentationsläufe stets bei der gleichen Konzentration durchgeführt. Dies ist erlaubt, wenn die Konzentrationsabhängigkeit des Sedimentationsverhaltens der verschiedenen Proben identisch ist; eine Bedingung, die erfüllt sein dürfte, solange zur Messung Untereinheiten des Tropokollagenmoleküls gelangen, welche sich in ihrer Grösse und Ladung nicht oder nur wenig unterscheiden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 12 zusammengefasst.

Tab. 12

Sedimentationskonstanten (Sc) von unbehandeltem sowie von nach Methode B mit Hydroxylamin umgesetztem Tropokollagen;

Material	Sc		Molverhältnis $\alpha:\beta$	EM-Befund nach Dialyse gegen ATP
	nativ c=0,151%	denat. c=0,513% 1. 2.		
TK unbeh.	2,30	2,98(α) 3,39(β)	1:1,06	Asymm. SLS
TK+NH ₂ OH	2,35	3,06(α) 3,65(β)	1:0,81	Ketten polymerer SLS
TK+NH ₂ OH + Trypsin	2,35	2,88(α) 3,69(β)	1:0,35	Isolierte Asymm.SLS bei pH 2,2 u. 3,0 sowie symm.SLS bei pH 3,5

Auf Grund der in Tab. 12 angegebenen Werte lassen sich für das nach Methode B behandelte Tropokollagen folgende Aussagen machen:

1. Natives, mit und ohne Trypsin behandeltes Hydroxam-Tropokollagen ergibt einen scharfen Gipfel; die Sedimentationskonstante von 2,35

Ergebnisse trotzdem in Bezug auf Sedimentationskonstanten und Mengenverhältnis der Fraktionen mit unbehandeltem Tropokollagen in Beziehung setzen zu können, wurden die Sedimentationsläufe stets bei der gleichen Konzentration durchgeführt. Dies ist erlaubt, wenn die Konzentrationsabhängigkeit des Sedimentationsverhaltens der verschiedenen Proben identisch ist; eine Bedingung, die erfüllt sein dürfte, solange zur Messung Untereinheiten des Tropokollagenmoleküls gelangen, welche sich in ihrer Grösse und Ladung nicht oder nur wenig unterscheiden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 12 zusammengefasst.

Tab. 12

Sedimentationskonstanten (Sc) von unbehandeltem sowie von nach Methode B mit Hydroxylamin umgesetzttem Tropokollagen;

Material	Sc		Molver- hältnis $\alpha:\beta$	EM-Befund nach Dialyse gegen ATP
	nativ c=0,151%	denat. c=0,513% 1. 2.		
TK unbeh.	2,30	2,98(α) 3,39(β)	1:1,06	Asymm. SLS
TK+NH ₂ OH	2,35	3,06(α) 3,65(β)	1:0,81	Ketten polymerer SLS
TK+NH ₂ OH + Trypsin	2,35	2,88(α) 3,69(β)	1:0,35	Isolierte Asymm.SLS bei pH 2,2 u. 3,0 sowie symm.SLS bei pH 3,5

Auf Grund der in Tab. 12 angegebenen Werte lassen sich für das nach Methode B behandelte Tropokollagen folgende Aussagen machen:

1. Natives, mit und ohne Trypsin behandeltes Hydroxam-Tropokollagen ergibt einen scharfen Gipfel; die Sedimentationskonstante von 2,35

welchem nur vereinzelt quergestreifte Fibrillen erkennbar waren.

Durch Dialyse des in verd. Essigsäure gelösten, mit Trypsin behandelten Materials gegen eine 0,4%-ige Lösung von ATP bei verschiedenen pH-Werten gelang eine quantitative Abscheidung in Form von Segmenten (SLS). Dabei wurden zwei verschiedene Segmentformen beobachtet: Ein Ausfällen der Segmente bei pH 2,2 und 3,0 führt zu den bekannten asymmetrischen Segmenten, welche durch parallele Anordnung der Tropokollagenmoleküle zustande kommen (EM-Aufnahme Nr. VII). Fällt man jedoch bei pH 3,5, so erhält man eine bisher nicht beobachtete symmetrische Form der SLS, die offenbar durch antiparallele Zusammenlagerung der Tropokollageneinheiten entstehen (EM-Aufnahme Nr. VIII).

Eine Untersuchung der nicht mit Trypsin behandelten Probe nach Dialyse gegen ATP-Lösung ergab gut strukturierte in Richtung Faserachse längs zusammengelagerte, polymere Segmente (EM-Aufnahme Nr. IX). Diese Erscheinung lässt auf eine Assoziation der Tropokollagenmoleküle durch Zusammenlagerung an den Enden schliessen.

b) Untersuchungen in der Ultrazentrifuge

Tropokollagen, welches nach Methode A mit Hydroxylamin behandelt, nach Abscheidung in Faserform in 8 m Harnstoff denaturiert und anschliessend gegen Citratpuffer dialysiert worden war, sedimentierte bei 40° in der Ultrazentrifuge als etwas verbreiteter Gipfel mit $s_o = 2,22$ S. Aus dieser Sedimentationskonstante errechnet sich nach der Beziehung von Williams, Saunders u. Cicirelli (90), welche für ein ungeordnetes Knäuelmolekül gilt, ein Molekulargewicht von etwa 30.000. Da es sich unter diesen Umständen naturgemäss um ein Gemisch verschiedener Abbauprodukte handeln muss, ist der errechnete Wert als mittleres Molekulargewicht der Reaktionsprodukte anzusehen.

Das nach Methode B dargestellte Material verhielt sich dagegen in der Ultrazentrifuge ähnlich wie unbehandeltes Tropokollagen.

Bei den Untersuchungen dieser Proben, die mit Tropokollagen verglichen werden konnten, wurde auf die Ermittlung der Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentation und somit auch auf die Bestimmung der jeweiligen s_o -Werte verzichtet, um die Anzahl der Sedimentationsläufe einzuschränken. Um die

Methode B:

Nach diesem Verfahren wurde in verd. Essigsäure gelöstes Tropokollagen in eine Hydroxylaminlösung eingerührt, wobei das Material sich nach vorübergehender Ausfällung rasch wieder löste. Das pH wurde auf 9,55 nachgestellt. Die Endkonzentration war gleichfalls 0,75 m an NH_2OH . Anschliessend wurde erst 24 Stunden gegen eine Hydroxylaminlösung gleicher Konzentration und gleichen pH-Wertes dialysiert; danach wurde das Tropokollagen durch Dialyse gegen Wasser mit einer Ausbeute von 90,5 % ausgefällt. Um unstrukturiertes, beim NH_2OH -Abbau entstehendes Material, welches, wie Vorversuche ergaben, die elektronenmikroskopischen Untersuchungen erheblich stört, zu entfernen, wurde an einem Teil der Proben eine Behandlung mit Trypsin in CaCl_2 -Lösung bei pH 8,0 vorgenommen. Das Enzym-Substrat-Verhältnis betrug 1 : 100.

Während der Inkubation veränderte sich die optische Drehung nur wenig; das bedeutet, dass kein wesentlicher Verlust an Tropokollagen zu verzeichnen war. Nach Dialyse gegen Wasser und Reinigen durch Umfällen aus Citratpuffer wurde das Produkt weiter untersucht.

In gleicher Weise wurde eine zweite Probe hergestellt, bei welcher zum Vergleich auf die Trypsinbehandlung verzichtet wurde.

a) Elektronenmikroskopische Untersuchungen: Bildung von Fibrillen und Segmenten (SLS) aus Hydroxylamin-gelöstem Tropokollagen

Bei der Arbeitsweise nach Methode A hatten Hörmann und Kühn bereits 1961 (19a) quergestreifte Fibrillen erhalten. Eine Abscheidung in Segmentform war damals jedoch noch nicht gelungen.

Aus beiden nach der Methode B mit Hydroxylamin behandelten Proben - einmal ohne und einmal mit Trypsineinwirkung - konnten in vorliegender Arbeit Fibrillen mit deutlicher elektronenmikroskopischer Querstreifung abgeschieden werden. Hierbei zeigte sich, dass die mit Trypsin behandelte Probe gut strukturierte Fibrillen in sehr hoher Ausbeute lieferte (EM-Aufnahme Nr. VI⁺), während die Untersuchung des nicht mit Trypsin behandelten Materials grosse Mengen unstrukturierter Materials ergab, in

⁺) EM-Aufnahmen siehe Teil VII, S. 98

2. Die Einwirkung von Hydroxylamin auf natives Tropokollagen

Die im vorangegangenen Abschnitt mitgeteilten Ergebnisse der Endgruppenbestimmung und der Sedimentationsversuche hatten gezeigt, dass die Peptidketten des Tropokollagens bei der Einwirkung von Hydroxylamin in Gegenwart von 4 molarem Lithiumchlorid, also unter Denaturierungsbedingungen, einen beträchtlichen Abbau erfahren. Diese Nebenreaktion war für die Klärung der Frage, ob es sich bei den Quervernetzungen des Kollagens um hydroxylaminspaltbare Bindungen handelt, sehr störend. Es wurde daher versucht, die Reaktionsbedingungen so weit abzuändern, dass eine Kettenspaltung möglichst vermieden wurde. Ein Erfolg in dieser Richtung war zu erwarten, wenn man Hydroxylamin auf natives Tropokollagen einwirken liess. In der nativen Proteinstruktur sollten die einzelnen Peptidbindungen wesentlich besser geschützt vorliegen als im denaturierten Molekül. Die erhaltenen Reaktionsprodukte sollten sowohl auf Endgruppen und Molekulargewicht der dissoziierten Untereinheiten als auch auf die Fähigkeit, in nativem Zustand Fibrillen und Segmente mit elektronenmikroskopischer Querstreifung zu bilden, untersucht werden.

Bei der Bearbeitung der Fragestellung ergab sich, dass Einzelheiten der Methodik das Molekulargewicht der Reaktionsprodukte sehr stark beeinflussten. In den ersten Versuchen wurde nach der sogleich zu beschreibenden Methode A verfahren. Bei dieser Arbeitsweise wurde noch ein stärkerer Abbau der Kollagenketten beobachtet. Bei der später verwendeten Methode B war ein solcher nicht mehr oder nicht mehr in wesentlichem Umfang nachzuweisen.

Methode A:

Hierbei wurde festes Tropokollagen in feinfaseriger, gefriergetrockneter Form bei pH 9,55 und 20° C in 0,75 m NH_2OH allmählich gelöst. Die Einwirkungszeit betrug 24 Stunden. Anschliessend wurde eventuell ungelöst gebliebenes Material abzentrifugiert und das gelöste Tropokollagen durch Dialyse gegen Wasser wieder ausgefällt. 101,27 mg Tropokollagen hatten sich in einem typischen Versuch in 12 ccm Hydroxylaminlösung vollständig gelöst. Es wurde nach dem Ausfällen durch Dialyse zu 66% wiedergewonnen.

ist die Spaltung bereits nahezu vollständig. Man erhält 95,6% der als DNP-Verbindung vorliegenden Aminogruppen. Nach weiteren 4 Stunden Hydrolyse in 6 n HCl tritt nur noch ein Rest von 4,4 % Endgruppen auf. Zu dieser Untersuchung schien dieses Material, das den höchsten Gehalt an Aminoendgruppen aufweist, am besten geeignet zu sein (siehe hierzu auch Teil III 3. a)).

Abb. 9 zeigt die Auftrennung der DNP-Komponenten aus Tropokollagen, welches durch $\text{NH}_2\text{OH-LiCl}$ gelöst worden war, nach Dinitrophenylierung und Hydrolyse an einer langen Perlonsäule (83,5 cm).

Abb. 9

Messkurve der quantitativen Trennung von DNP-Derivaten aus $\text{NH}_2\text{OH-LiCl}$ -gelöstem, dinitrophenyliertem Tropokollagen an Polyamid;

A: DNP-NH_2

B: DNP-OH

Aminoendgruppen:

C: DNP-Gly u. DNP-Asp

Säulenlänge 83,5 cm, ϕ 9mm;

Lsgm.: DMFA, Eisessig,

Wasser, Äthanol wie

5 : 10 : 30 : 20

Aufgetragene Menge

entspricht 131,0 mg

DNP-Tropokollagen

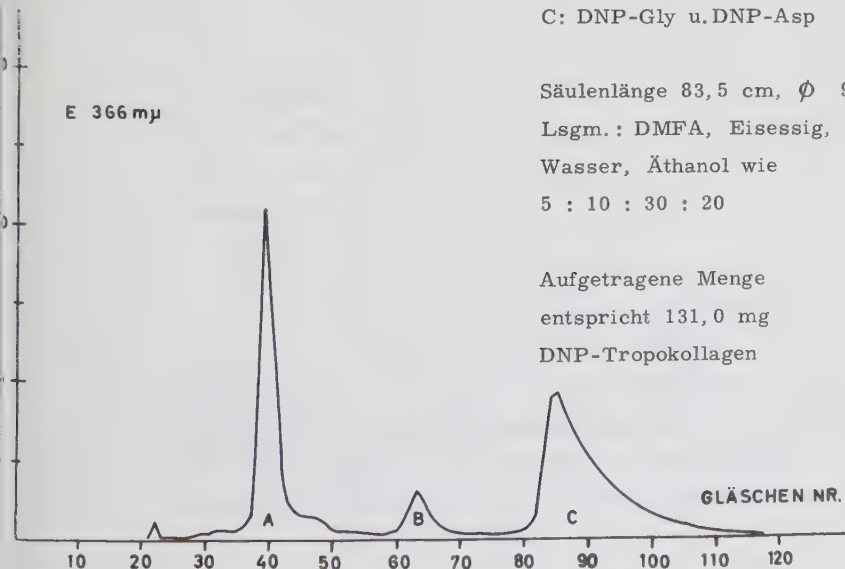
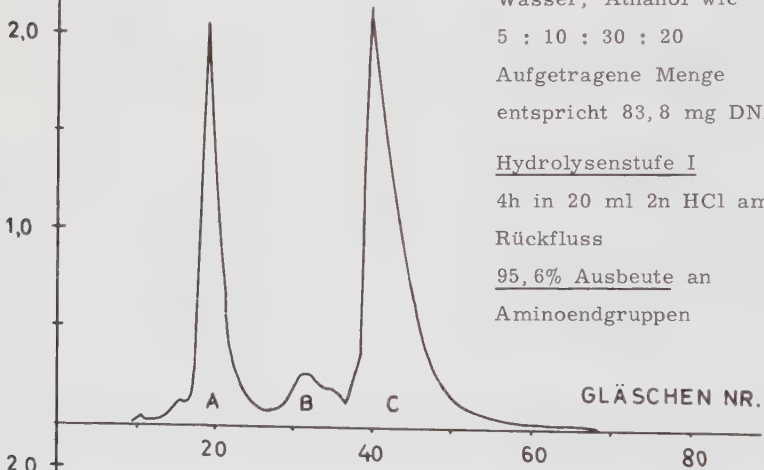


Abb. 8

Messkurve der quantitativen
Trennung von DNP-Derivaten
aus NH_2OH -LiCl-gelöstem,
dinitrophenyliertem Kollagen
an Polyamid

E 366 m μ



A: DNP- NH_2

B: DNP-OH

Aminoendgruppen:

C: DNP-Gly u. DNP-Asp

Säulenlänge 41 cm, ϕ 9 mm;

Lsgm.: DMFA, Eisessig,

Wasser, Äthanol wie

5 : 10 : 30 : 20

Aufgetragene Menge

entspricht 83,8 mg DNP-Koll.

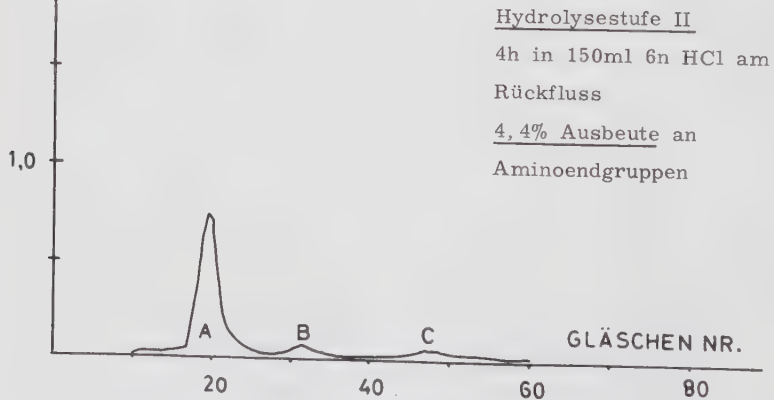
Hydrolysestufe I

4h in 20 ml 2n HCl am

Rückfluss

95,6% Ausbeute an

Aminoendgruppen



Hydrolysestufe II

4h in 150ml 6n HCl am

Rückfluss

4,4% Ausbeute an

Aminoendgruppen

Molekulargewicht treten jedoch noch viel zu wenig Endgruppen auf, wenn man voraussetzt, dass jede Spaltstelle innerhalb der α -Kette (Mol.Gew. 120.000) zu einer neuen Aminoendgruppe führen sollte. In diesem Falle wären etwa 10 Mol Endgruppen pro 1.000 Mol Aminosäuren zu erwarten. In der Diskussion sollen diese Ergebnisse ausführlicher behandelt werden.

Tab. 11

Aminoendgruppen und Molekulargewichte von Tropokollagen und Kollagen nach Auflösung durch $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{LiCl}$;

Versuchsbedingungen: 0,75 m NH_2OH /4m LiCl, pH 9,55, 37° C;

	Tropokollagen	Kollagen
Einwirkungszeit(h)	7	12
Aminoendgruppen Mol/1.000 Mol AS	1,73	3,90
davon Asp %	5	21
Gly %	95	79
Spuren	Glu, Ser, Ala	Glu, Ser, Ala
Mol.-Gew.	≈ 10.000	≤ 10.000

Abb. 8 zeigt die Trennung der DNP-Komponenten aus $\text{NH}_2\text{OH}/\text{LiCl}$ -behandeltem Kollagen nach Dinitrophenylierung und Hydrolyse an der Polyamidsäule.

Im Anschluss an die in Teil III 1. b) beschriebenen Untersuchungen zum Verlauf der Hydrolyse wurden hierbei bereits nach der ersten Hydrolysestufe die Endgruppe durch Säulenchromatographie bestimmt. Eine nachfolgende Bestimmung nach der zweiten Hydrolysestufe sollte zeigen, ob unter den angewandten Hydrolysebedingungen tatsächlich eine quantitative Abspaltung der dinitrophenylierten Aminoendgruppen erfolgt. Abb. 8 zeigt, dass dies annähernd der Fall ist. Nach vierstündiger Hydrolyse in 1nHCl

1. Die Einwirkung von Hydroxylamin auf Kollagen in Gegenwart von Lithiumchlorid

Die bisherigen Versuche von Gallop, von Hörmann und Klenk hatten sich vor allem mit der Einwirkung von Hydroxylamin auf denaturiertes Kollagen befasst. Gallop, der hitzedenaturiertes Tropokollagen als Substrat verwendet hatte, fand dabei eine Abnahme des Molekulargewichtes von 120.000 bzw. 240.000 auf etwa 25.000. Gleichzeitig bildeten sich etwa 6 Mol Hydroxamsäuren pro 1.000 Mol Aminosäuren. Von Hörmann und Klenk, die Hydroxylamin in Gegenwart von 4 m LiCl auf Tropokollagen und Kollagen einwirken liessen, lagen bisher noch keine Angaben über Molekulargewichte der Reaktionsprodukte vor. Die Menge der nach Reaktion mit Tropokollagen gefundenen Hydroxamsäuren (6,4 Mol/1.000 Mol Aminosäuren) stimmte mit den von Gallop (25) angegebenen Werten überein. Im Falle des Kollagens bildeten sich 10,4 Mol Hydroxamsäuren pro 1.000 Mol Aminosäuren. Der Unterschied wird auf die intermolekularen Quervernetzungen zurückgeführt. Im folgenden wurde Tropokollagen und reifes Kollagen nach der von Hörmann und Klenk erarbeiteten Methode durch 0,75 m NH_2OH und 4 m LiCl bei pH 9,55 und 37°C innerhalb von 7 bzw. 12 Stunden in Lösung gebracht. Nach Dialyse wurden die beiden Proben in der Ultrazentrifuge untersucht. Gleichzeitig wurden nach Dinitrophenylierung die Aminoendgruppen bestimmt. Die Versuche sollten erstens klären, ob und in welchem Umfang bei gleichzeitiger Einwirkung von NH_2OH und LiCl mit Kettenspaltungen zu rechnen ist; zweitens war festzustellen, ob die Menge an ermittelten Endgruppen mit den durch Sedimentationsversuche bestimmten Molekulargewichten übereinstimmt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 11 enthalten.

Die Tab. 11 zeigt, dass bei beiden Proben freie Aminoendgruppen feststellbar sind. Das LiCl/ NH_2OH -gelöste Kollagen enthält im Vergleich zu LiCl/ NH_2OH -behandeltem Tropokollagen etwa die doppelte Menge an Endgruppen. Gegenüber dem bis auf etwa 10.000 (und tiefer) abgesunkenen

Bei der Beurteilung der kleinen, dennoch nachweisbaren Menge an Endgruppen nach Behandlung mit Perjodat-Harnstoff muss berücksichtigt werden, dass bei 14-tägigem Stehen bei Zimmertemp. in 10%-iger Essigsäure mit geringfügigen unspezifischen Spaltungen durch Hydrolyse zu rechnen ist.

V. Untersuchungen an Kollagen nach Behandlung mit Hydroxylamin

Neben der in Kapitel IV untersuchten Umsetzung von Kollagen mit Pepsin und Perjodat sollten mit der Methode der Endgruppenbestimmung auch die durch Einwirkung von Hydroxylamin auf Kollagen hervorgerufenen Veränderungen studiert werden.

Erste Versuche von Gallop (25) hatten ergeben, dass Tropokollagen esterartige Bindungen enthält, die durch Einwirkung von Hydroxylamin zu Hydroxamsäuren umgesetzt werden können. Gallop hatte bei seinen Untersuchungen hitzedenaturiertes Tropokollagen verwendet.

Nach Arbeiten von Hörmann und Klenk (19, 26) lässt sich reifes Kollagen durch gleichzeitige Einwirkung von Hydroxylamin und Wasserstoffbrücken sprengenden Agentien wie LiCl rasch und vollständig in Lösung bringen, während mit Hydroxylamin vorbehandeltes Material durch nachfolgende Einwirkung von LiCl sehr langsam und nur teilweise gelöst wird. Es handelt sich hierbei neben der Einwirkung von Pepsin und Perjodat um ein drittes Verfahren, durch welches Kollagen hochmolekular in Lösung gebracht werden kann.

Diese Ergebnisse wurden damit gedeutet, dass Hydroxylamin die Quervernetzungen des Kollagens spaltet (siehe dazu S. 5). In Fortführung dieser Untersuchungen sollte durch Sedimentationsversuche in der Ultrazentrifuge sowie durch Endgruppenbestimmungen festgestellt werden, ob und in welchem Umfang die Einwirkung von Hydroxylamin in Abwesenheit und in Gegenwart von Wasserstoffbrückensprengern zur Spaltung von Peptidketten führt.

3. Diskussion der Ergebnisse

In Übereinstimmung mit den Vorstellungen von F.O.Schmitt (44) und Nishihara (41) zeigen die in Tab. 9 zusammengefassten Ergebnisse, dass pepsingelöstes Kälberkollagen Aminoendgruppen besitzt, während an unbehandeltem Tropokollagen praktisch keine nachgewiesen werden konnten. Die Menge an auftretenden Endgruppen ist gering und beträgt etwa 0,3 Mol/1.000 Mol AS, was bedeuten würde, dass nur eine der drei Peptidketten des Tropokollagenmoleküls durch Pepsineinwirkung am Aminoende geschädigt wurde. Nach F.O.Schmitt (44) sollen diese proteaselabilen, über die Enden der Dreierspirale des Tropokollagenmoleküls hinausragenden Teloptide auf noch ungeklärte Weise die Polymerisation der Tropokollagenmoleküle zu Fibrillen des nativen Typs erleichtern. Untersuchungen von Hörmann und Hafter (89) ergaben, dass mit steigender Pepsinkonzentration grössere Mengen an Telozeptiden abgespalten werden. Die Werte in Tab. 9 zeigen, dass sich bei mehrfachem Reinigen des Materials durch Umfällen der Endgruppengehalt nur unwesentlich verringert. Die kleinen auftretenden Differenzen werden durch eine stufenweise Eliminierung niedrigmolekularer, dialysierbarer Peptide in befriedigender Weise erklärt. Die Endgruppenbestimmungen an Kollagen nach Auflösung durch Perjodat-Harnstoff ergaben einen sehr geringen Gehalt an freien α -Aminogruppen (Tab. 10). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Untersuchungen von Hörmann und Fries (35a), die weder eine Freisetzung zusätzlicher Aminoendgruppen noch die Abspaltung dialysierbarer Eiweissbruchstücke durch Einwirkung von Perjodat feststellen konnten. Da die Endgruppenbestimmungen in der zitierten Arbeit nach einer relativ groben Methode (von Slyke) durchgeführt wurden, bedurften sie einer Überprüfung durch ein auch sehr kleine Mengen genau erfassendes Verfahren.

Mit Sicherheit kann festgestellt werden, dass ein Aufbrechen der Peptidkette des Tropokollagenmoleküls, wie es von Graßmann und Kühn (34) im Falle der Einwirkung von Phenyljodosoacetat beobachtet wurde, durch Behandlung mit Perjodat-Harnstoff nicht erfolgt. Die Autoren hatten eine mittlere Kettenlänge von 21 - 25 Aminosäuren ermittelt!

2. α -Amino-Endgruppenbestimmung an Rinderkollagen nach Auflösung durch Perjodat-Harnstoff

Hörmann und Klenk (19, 26) haben die Vorstellung entwickelt, dass die Hexosen des Kollagens an den Quervernetzungen beteiligt sind. Die Grundlage dafür bietet das Verhalten von Kollagen bei der Einwirkung von Perjodat.

Im Anschluss an diese Untersuchungen sollte geprüft werden, ob eine Einwirkung von Perjodat in Gegenwart von 8 m Harnstoff - Reaktionsbedingungen unter denen reifes Kollagen in Lösung geht - ebenfalls zur Spaltung der Peptidkette führt.

Zu diesem Zweck wurde Rinderkollagen in 10%-iger Essigsäure in Gegenwart von 8m Harnstoff 14 Tage lang bei 20° C mit 0,02m Perjodat behandelt. Nach Zerstörung des überschüssigen Oxydationsmittels durch Zusatz von Na_2SO_3 , wurde das gelöste Material durch Dialyse von Salz befreit, anschliessend gefriergetrocknet, in Gegenwart von 2,5 m NaClO_4 dinitrophenyliert und zur Endgruppenbestimmung eingesetzt.

Die Ergebnisse des Versuchs sind in Tab. 10 zusammengestellt. Das gelöste Kollagen enthält nur eine sehr geringe Menge an Endgruppen. Beim Angriff von Perjodat ist somit nicht oder nur in sehr geringem Umfang eine Spaltung von Peptidbindungen erfolgt.

Tab. 10

Aminoendgruppen von Rinderkollagen nach Auflösung durch Perjodat-Harnstoff.

Reaktionsbedingungen: 0,02m Perjodat + 8m Harnstoff in 10% Essigsäure, 14 Tage bei 20° C;

Asp + Gly Mol/1.000 Mol AS	% Asp	% Gly	Spuren
0,27	22	78	Glu, Ser, Ala

erfassende Endgruppenbestimmung zu gewährleisten. Zu diesem Zweck wurde die klare Lösung nach gründlichem Zentrifugieren gegen 0,02 m NaHPO_4 -Puffer dialysiert. Das ausgefällte Material wurde zur weiteren Reinigung in Citratpuffer (pH 3,3) gelöst und nach gründlichem Zentrifugieren erneut durch Dialyse gegen 0,02 m Phosphatpuffer ausgefällt. Das derart vorgereinigte Material wurde nun noch zweimal in gleicher Weise durch Lösen in Citratpuffer, gründliches Zentrifugieren und erneutes Fällen durch Dialyse gegen verd. Phosphatpuffer umkristallisiert. Anschliessend an jede der drei Reinigungsstufen wurde nach erfolgter Umsetzung mit DNFB in 2,5 m NaCl Lösung, jeweils eine Endgruppenbestimmung durchgeführt. Dieser Versuch sollte zeigen, ob durch die stufenweise Reinigung des Materials ein konstanter Endwert erreicht werden kann. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 9 wiedergegeben. Wie man aus Tab. 9 entnehmen kann, lassen sich in pepsingelöstem Kälberkollagen Endgruppen nachweisen, die gegenüber nativem Tropokollagen deutlich vermehrt sind. Die Menge beträgt nach mehrmaligem Umdialysieren des gelösten Kollagens etwa 0,3 Mol/1.000 Mol Aminosäuren. Bei den letzten Reinigungsoperationen hatten die Endgruppen nur mehr geringfügig abgenommen, so dass die angegebene Menge als konstant angesehen werden kann.

Tab. 9

Aminoendgruppen von Tropokollagen und pepsingelöstem Kälberkollagen;
Kollagen: Enzym = 500 : 1 in 0,02 n HCl , 70 h bei 20° C;

	Asp + Gly Mol/1.000 Mol AS	% Asp	% Gly	Spuren
Tropokollagen	0,08	6	94	--
Pepsingel. Kälberkollagen				
1x umkrist.	0,45	26	74	
2x umkrist.	0,37	29	71	Glu, Ser,
3x umkrist.	0,31	38	62	Leu

gruppe des Cytochroms C aus Pferdeherz (54), der Proteinkomponente des Tabakmosaikvirus (55) und wie es scheint auch die des Ovalbumins (52) und anderer Proteine acetyliert ist. In der B-Kette des Fibrinogens wurde N-terminal Pyrrolidincarbonsäure nachgewiesen (104), so dass hier gleichfalls keine freie Aminoendgruppe vorliegt. Neben diesen Möglichkeiten ist beim Kollagen noch eine Maskierung durch Mucopolysaccharide zu erwägen.

IV. α -Aminoendgruppenbestimmung an Kollagen nach Einwirkung von Pepsin sowie Perjodat-Harnstoff

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die ausgearbeitete und in Teil III beschriebene Methode zur Aminoendgruppenbestimmung auf eine Reihe in verschiedener Weise modifizierter Kollagenproben angewandt. Zunächst war die Frage zu klären, ob bei der Behandlung von Kollagen mit Pepsin, sowie mit Perjodat-Harnstoff Endgruppen entstehen. Der Untersuchung dieser Frage kommt, wie man aus den Ausführungen auf Seite 7 und Seite 9 entnehmen kann, eine grosse Bedeutung bei der Beurteilung von Schlussfolgerungen zu, die aus den Ergebnissen der Reaktion des Kollagens mit Pepsin und Perjodat gezogen werden.

1. α -Aminoendgruppenbestimmung an Kälberkollagen nach Einwirkung von Pepsin

Das Kollagen jüngerer Tiere, z.B. Kälberkollagen, lässt sich durch Pepsin bei niedriger Temperatur verhältnismässig rasch und vollständig in nativer Form in Lösung bringen (42). Daher wurde zur Durchführung von Endgruppenbestimmungen Kälberkollagen in 0,02n HCl 70 h lang bei 20° C und einem Enzym-Substratverhältnis von 1 : 500 mit Pepsin behandelt. Das zugesetzte Pepsin, die nicht kollagenen Begleitsubstanzen, sowie die durch Pepsineinwirkung abgespaltenen Teloptide mussten nun möglichst quantitativ entfernt werden, um eine exakte, nur die N-terminalen Aminosäuren des Tropokollagenmoleküls

α -Aminoendgruppen pro 1.000 Mol AS, also praktisch keine freien Aminoendgruppen besitzt. Damit konnten die Resultate der Arbeiten von Graßmann und Hörmann (48), Bowes und Moss (38), Joseph und Bose (49), sowie eine Reihe anderer Autoren (85) bestätigt werden. Die von den zuletzt genannten Autoren gefundenen Werte bewegen sich in der gleichen Größenordnung von 0,05 - 0,2 Mol/1.000 Mol AS. Bei einem Molekulargewicht des Kollagens von 360.000 sollte unter der Voraussetzung, dass jede der 3 Ketten der Dreierspirale des Tropokollagenmoleküls jeweils eine Aminoendgruppe trägt, auf etwa 1.000 Mol AS 1 Mol Endgruppen entfallen. Dieser Wert wird jedoch nicht annähernd erreicht. Auch die Annahme, dass eine Kette eine freie α -Aminoendgruppe trägt, findet in den Ergebnissen keine Stütze. Bei den geringen Mengen an nachweisbaren Endgruppen kann es sich daher nur um nichtkollagene Begleitproteine sowie um die Produkte unspezifischer, im Verlauf der Darstellung und Aufarbeitung entstandener Spaltungen handeln. Der in der Arbeit von Deasy (56) beschriebene Nachweis einer etwa einem Mol Endgruppen pro 1.000 Mol AS entsprechenden Menge an Gly, Asp und Ser ist darauf zurückzuführen, dass die nach Hydrolyse des DNP-Kollagens und Extraktion erhaltenen ätherlöslichen Produkte ohne Trennung summarisch ausgewogen wurden. Da das DNP-Kollagen zudem nach der Dinitrophenylierung nicht extrahiert wurde, muss der weitaus grösste Teil der ausgewogenen DNP-Verbindungen aus DNP-OH und DNP-NH₂ bestanden haben.

Da auch in der darauf folgenden Trennung der DNP-Derivate an Kieselgel-Celite die Komponenten nicht quantitativ sondern nur qualitativ bestimmt wurden, ist das Ergebnis dieser allen anderen Untersuchungen widersprechenden Arbeit nicht genügend gesichert.

Die Frage, wodurch die Aminoendgruppen des Kollagens der Dinitrophenylierung und damit dem Nachweis entzogen werden, ist noch nicht geklärt. In den letzten Jahren wurde festgestellt, dass sich auch an zahlreichen anderen Proteinen keine freien Aminoendgruppen nachweisen lassen (52, 53). Inzwischen wurde jedoch bekannt, dass die Aminoend-

und DNP-Asp betrugen bei den Vorversuchen 64 bzw. 79%. Hydrolysiert man - wie es den tatsächlichen Verhältnissen besser entspricht - unter Zusatz von DNP-Kollagen, so betragen die Ausbeuten sogar 87 bzw. 96%. (Vergl. Tafel 5)

Dass unter diesen Bedingungen die DNP-Aminosäuren von DNP-Kollagen quantitativ abgespalten werden, wurde in Teil V, Abb. 8 an einem modifizierten Kollagenpräparat gezeigt, das den höchsten in dieser Arbeit gefundenen Gehalt an Aminoendgruppen aufweist. 96% aller vorhandenen DNP-Aminosäuren wurden bereits während der ersten Hydrolysestufe freigesetzt; nach der zweiten Stufe wurde nur noch ein Rest von 4% des gesamten Endgruppengehaltes isoliert.

3. Die Empfindlichkeit der quantitativen Bestimmung der abgespaltenen DNP-Aminosäuren, DNP-Asp und DNP-Gly, die neben Dinitrophenol und Dinitranilin vorliegen, wurde durch Chromatographie an Polyamid erheblich verbessert. Bei dieser Trennung wandern die DNP-Verbindungen als schmale Banden verhältnismässig rasch durch die Säule ohne sich zu verschmieren, wie dies bei Chromatographie an Kieselgel der Fall ist (87, 88, 80c). Die Trennung erlaubt sichere Bestimmungen von 0,5 μ Mol DNP-Glycin bzw. DNP-Asparaginsäure pro Gramm Kollagen. Dies entspricht einer Menge von 0,05 Mol Endgruppen pro 1.000 Mol Aminosäuren bzw. 0,12 - 0,15 mg DNP-Gly bzw. DNP-Asp (vergl. Tab. 7). Zur Identifizierung der aufgetrennten DNP-Verbindungen und zur Kontrolle von etwa vorhandenen Begleitkomponenten bewährte sich als empfindliche und rasch durchführbare Methode eine dünnschichtchromatographische Analyse nach der Methode von Brenner und Niederwieser (82).

Abschliessend ist zu bemerken, dass die Methode und damit auch die Ergebnisse der an Kollagen durchgeführten Endgruppenbestimmungen durch einen an Rinderserumalbumin vorgenommenen Kontrollversuch bestätigt werden konnten (Tab. 8, Abb. 6 und 7).

b) Die Ergebnisse der α -Amino-Endgruppenbestimmungen an Kollagen

Die in Tab. 7 zusammengefassten Ergebnisse der Endgruppenbestimmungen an Tropokollagen und Kollagen zeigen, dass Kollagen weniger als 0,2 Mol

Diskussion der Ergebnisse

a) Zur Methode

Im folgenden werden die Verfeinerungen des in dieser Arbeit angewendeten Verfahrens zur Bestimmung von α -Aminoendgruppen gegenüber den bisher gebräuchlichen Methoden zusammengefasst:

1. In früheren Untersuchungen hatten verschiedene Autoren bereits festgestellt, dass in Kollagen keine freien Aminoendgruppen nachweisbar sind (38, 48, 49, 85). Diese negativen Ergebnisse könnten möglicherweise damit erklärt werden, dass die Endgruppen im nativen Protein der Umsetzung mit DNFB nicht zugänglich sind. Auch bei den Bestimmungen an denaturierte Tropokollagen waren gegen eine Renaturierung während der Umsetzung von keinem Autor Massnahmen ergriffen worden. In dieser Arbeit wurde eine Renaturierung während der Reaktion durch Dinitrophenylierung in 2,5 m NaClO_4 -Lösung ausgeschlossen und die Voraussetzung für eine quantitative Umsetzung gegeben. Auf gleiche Weise konnte, wie in Teil II berichtet (vergl. Tab. 4) eine vollständige Substitution der ϵ -Aminogruppen erreicht werden, die von einigen Autoren offensichtlich aus dem gleichen Grunde als nicht quantitativ erfassbar beschrieben wurden (38, 39, 86). Tropokollagen konnte nach dieser Methode ausserdem in homogener Lösung umgesetzt werden, was ebenfalls zu einer raschen und vollständigeren Substitution beitrug.

2. Eine weitere Fehlerquelle bei Aminoendgruppenbestimmungen besteht in den Verlusten, die bei der Hydrolyse von DNP-Verbindungen auftreten. Von DNP-Asp und DNP-Gly z.B. wurden nach 18-stündiger Hydrolyse mit 6n HCl 60 bzw. 16% wiedergewonnen (46b, 85). Um diese Verluste möglichst klein zu halten, wurde in der vorliegenden Arbeit das DNP-Protein in zwei Stufen je 4 h hydrolysiert, wobei die Hauptmenge der abzuspal tenden DNP-Aminosäuren bereits nach kurzen Hydrolysenzeiten abgetrennt und lediglich der verbliebene noch nicht hydrolysierte Rest längere Zeit der Säureeinwirkung ausgesetzt wurde. Die Ausbeuten an DNP-Gly

Abb. 7

Trennung und Identifizierung
der α -Amino-Endgruppe von
Rinderserumalbumin durch ein-
dimensionale Dünnschicht-
chromatographie auf Kieselgel
(DNP-Methode)

Als Vergleichssubstanzen
aufgetragen:

I DNP-Asp,

II DNP-OH,

III DNP-NH₂,

IV DNP-Rinderserumalbumin
nach Hydrolyse

Lösungsmittel:

Benzol: Pyridin: Eisessig

80 : 20 : 20

Kieselgel G nach Stahl

(Aufsteigend)

UV-Photoprintkopie

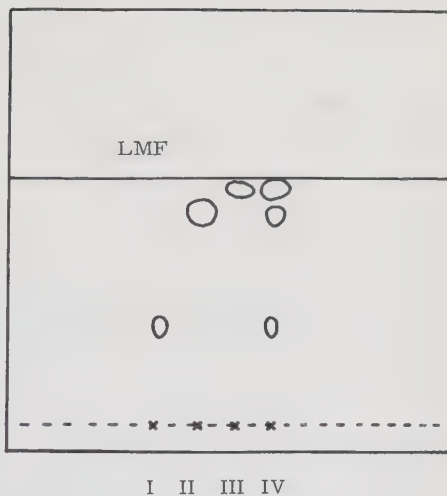
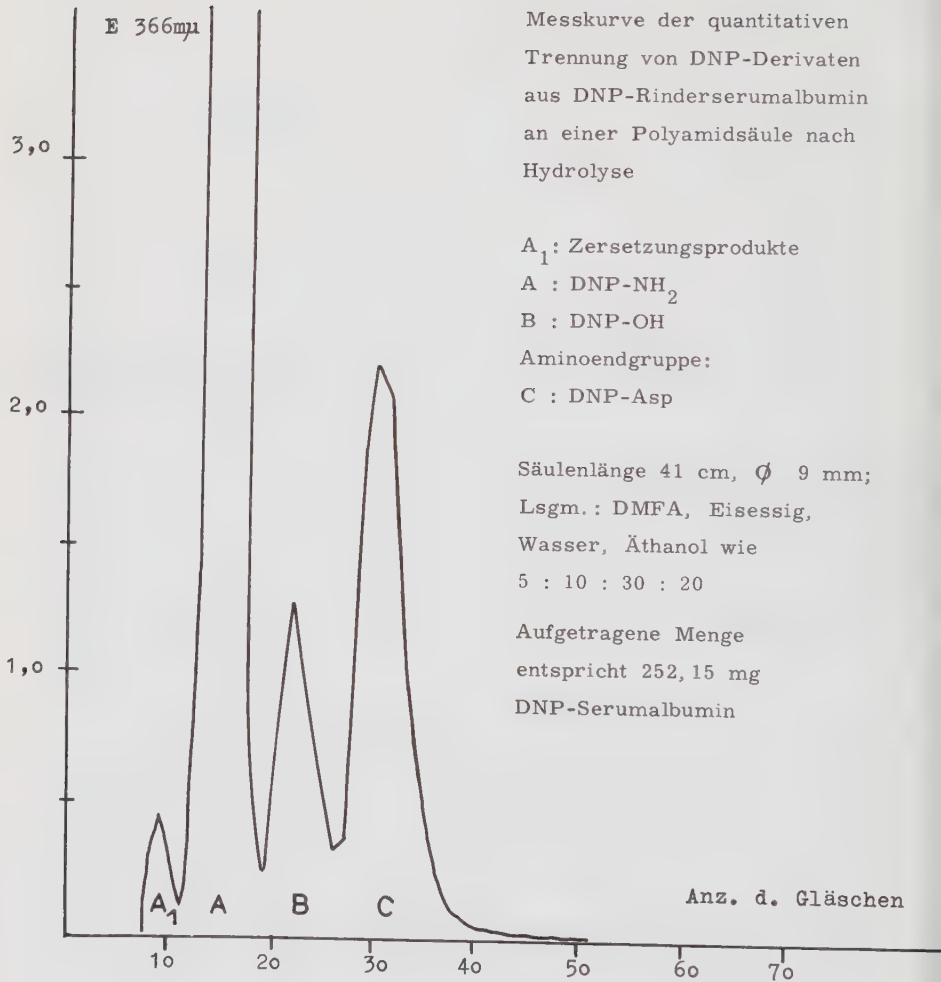


Abb. 6



pro Gramm Serumalbumin bzw. von 1,5 Mol Asp pro 1.000 Mol Aminosäuren. Die Endgruppenbestimmung ergab einen Gehalt von 0,0095 mMol Asp pro Gramm Protein. Das entspricht einer Ausbeute von 65% der Theorie, was bei den ausserordentlich verschärften Hydrolysebedingungen, die zu relativ hohen Verlusten an DNP-Asp führen, als durchaus befriedigendes Ergebnis bezeichnet werden kann.

Das Resultat der Analyse ist in Tab. 8 noch einmal übersichtlich dargestellt.

Tab. 8

Ergebnis der α -Amino-Endgruppenbestimmung an Rinderserum-Albumin

Mol. Gew. 65.000

	mMol Asp/Gramm	Mol Asp/1.000Mol As	Ausbeute %
ber.	0,015	1,50	100
gef.	0,0095	0,95	65

b) Quantitative Bestimmung der α -Aminoendgruppe des Rinderserum-Albumins (als Kontrollversuch)

Zur Kontrolle der angewandten Methode wurde an einem gut untersuchten Protein, und zwar an Rinderserum-Albumin, auf gleiche Weise eine Endgruppenbestimmung durchgeführt.

Rinderserum-Albumin besteht aus einer einzigen Polypeptidkette mit einer freien α -Amino- und einer freien α -Carboxylgruppe. Am Aminoende steht beim Serumalbumin des Rindes (wie auch bei dem des Menschen, Pferdes und Schweines) Asparaginsäure (83). Das Molekulargewicht beträgt 65.000 (84).

Das Rinderserum-Albumin wurde nach dem beschriebenen Verfahren durch Lösen in 2,5 molarem NaClO_4 denaturiert. Danach wurde in der auf pH 9,0 gebrachten Lösung, welche 4% NaHCO_3 enthielt, dinitrophenyliert. Anschließend folgte Extraktion des überschüssigen DNFB, Dialyse gegen Wasser zur Entfernung der Salze, Gefriertrocknung und Extraktion des DNP-OH durch Äthanol. Die Hydrolyse des DNP-Rinderserum-Albumins musste jedoch unter weitaus schärferen Bedingungen durchgeführt werden, als sie beim DNP-Kollagen zur Anwendung kamen, da sich herausstellte, dass das DNP-Serumalbumin anders als DNP-Kollagen, nur durch starke, siedende Salzsäure allmählich gelöst wird. Demnach wurde das Produkt in der 1. Stufe 4 h in 8n HCl hydrolysiert. Nach Extraktion wurde die wässrige Phase auf 10n an HCl gebracht und erneut 4 h am Rückfluss gekocht.

Abb. 6 zeigt die Messkurve der quantitativen Trennung von DNP-Derivaten aus DNP-Rinderserum-Albumin an einer Polyamidsäule. Auch in diesem Falle traten relativ grosse Mengen an DNP-NH₂ und DNP-OH auf. Abb 7 zeigt eine Auftrennung in die Komponenten durch eindimensionale Dünnschichtchromatographie mit den entsprechenden Vergleichssubstanzen.

Auf Grund des Molekulargewichtes von 65.000 errechnet sich, bei einem Mol Asparaginsäure als Amino-Endgruppe, ein Gehalt von 0,015 mMol Asp

Tab. 7

Bestimmung N-terminaler Aminosäuren an Kollagen

Mol/ 1.000 Mol AS

Material	DNP-NH ₂	DNP-OH	DNP-Aminosäuren ⁺			
			Gesamt- menge	davon Asp	% Gly	Spuren
Kollagen nat.	0,92	0,93	0,13	8	92	Ala
Kollagen denat.	2,74	1,15	0,12	32	68	-
Tropokollagen nat.	0,79	0,46	0,08	6	94	-
Tropokollagen denat.	3,73	9,21	0,17	19	81	-

⁺ Die Errechnung der Werte für DNP-Gly und DNP-Asp geschah unter Verwendung eines aus Tab. 5 entnommenen, den durch die Hydrolyse bewirkten Verlust von 14,2% (Ausbeute = 85,8%) berücksichtigenden Korrekturfaktors.

Der prozentuale Anteil an DNP-Gly und DNP-Asp wurde durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel nach der Methode von Brenner, Niederwieser und Pataki (82) bestimmt (Abb. 5). Nach der Elution der Flecken und Messung der Extinktionen durch Vergleich mit mitgelaufenen Proben von bekanntem Gehalt an DNP-Gly und DNP-Asp, konnte das Verhältnis DNP-Gly: DNP-Asp berechnet werden.

Abb. 5

Trennung und Identifizierung der
 α -Aminoendgruppen von nativem
 Tropokollagen durch zweidimensionale
 Dünnschichtchromatographie auf Kiesel-
 gel (DNP-Methode)

Lösungsmittel:

1. Dimension:

Toluol: Pyridin:

Äthylenchlorhydrin:

0,8n Ammoniak wie

100 : 30 : 60 : 60

2. Dimension:

Benzol: Pyridin:

Eisessig wie

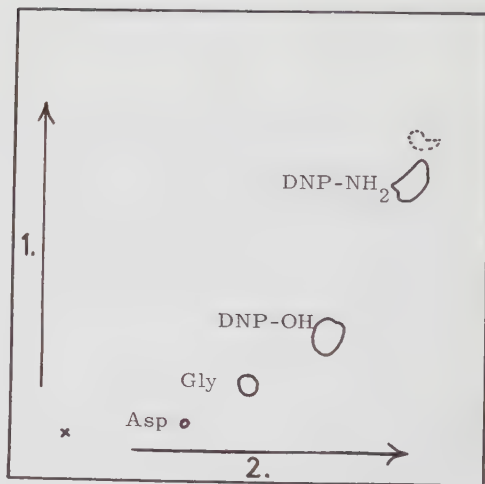
80 : 20 : 20

Kieselgel G nach

Stahl

(Aufsteigend)

UV-Photoprintkopie



A wurde dünn. schichtchromatographisch als Dinitroanilin, B als Dinitrophenol identifiziert. In Fraktion C fanden sich DNP-Asparaginsäure und DNP-Glycin. Diese stellen offensichtlich die Endgruppen dar.

Zur quantitativen Bestimmung der α -Aminoendgruppen mussten die auftretenden Mengen an DNP-Gly und DNP-Asp im Eluat gemeinsam bestimmt werden, da sie, wie aus Tab. 6 sowie aus Abb. 2 hervorgeht, an Polyamid einen ähnlichen Rf-Wert besitzen. Zur Berechnung der Ergebnisse wurde ein Extinktionskoeffizient verwendet, der das Mittel aus den Extinktionskoeffizienten von DNP-Gly und DNP-Asp (Tab. 6) darstellt.

Abb. 5 zeigt als typisches Beispiel die Auftrennung der gesamten DNP-Verbindungen des Hydrolysates von nativem DNP-Tropokollagen durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie. Man erkennt deutlich, dass neben den beschriebenen DNP-Verbindungen keine weiteren Komponenten nachweisbar sind.

Die in Tab. 7 zusammengefassten Werte enthalten die Ergebnisse der α -Amino-Endgruppenbestimmungen an nativem und denaturiertem Tropokollagen und Kollagen. Der Anteil des Glycins betrug in allen Fällen zwischen 68 und 94% der gesamten Endgruppen. An Spuren wurde lediglich bei nativem Kollagen Alanin nachgewiesen. Neben den Endgruppen wurden die gleichzeitig auftretenden, stark schwankenden Mengen an DNP-NH₂ und DNP-OH angeführt.

2. Ergebnisse

a) α -Aminoendgruppen von nativem und denaturiertem Tropokollagen und Kollagen

Abb. 4 zeigt als typisches Beispiel die säulenchromatographische Auftrennung der DNP-Verbindungen des Hydrolysates von nativem DNP-Tropokollagen. Man erhält eine scharfe Trennung in 3 Gipfel.

Abb. 4

Messkurve der quantitativen
Trennung von DNP-Derivaten
aus nativem DNP-Tropokollagen
an einer Polyamidsäule

A: DNP-NH₂

B: DNP-OH

Aminoendgruppen:

C: DNP-Gly u. DNP-Asp

Säulenlänge 41 cm, Φ 9 mm;

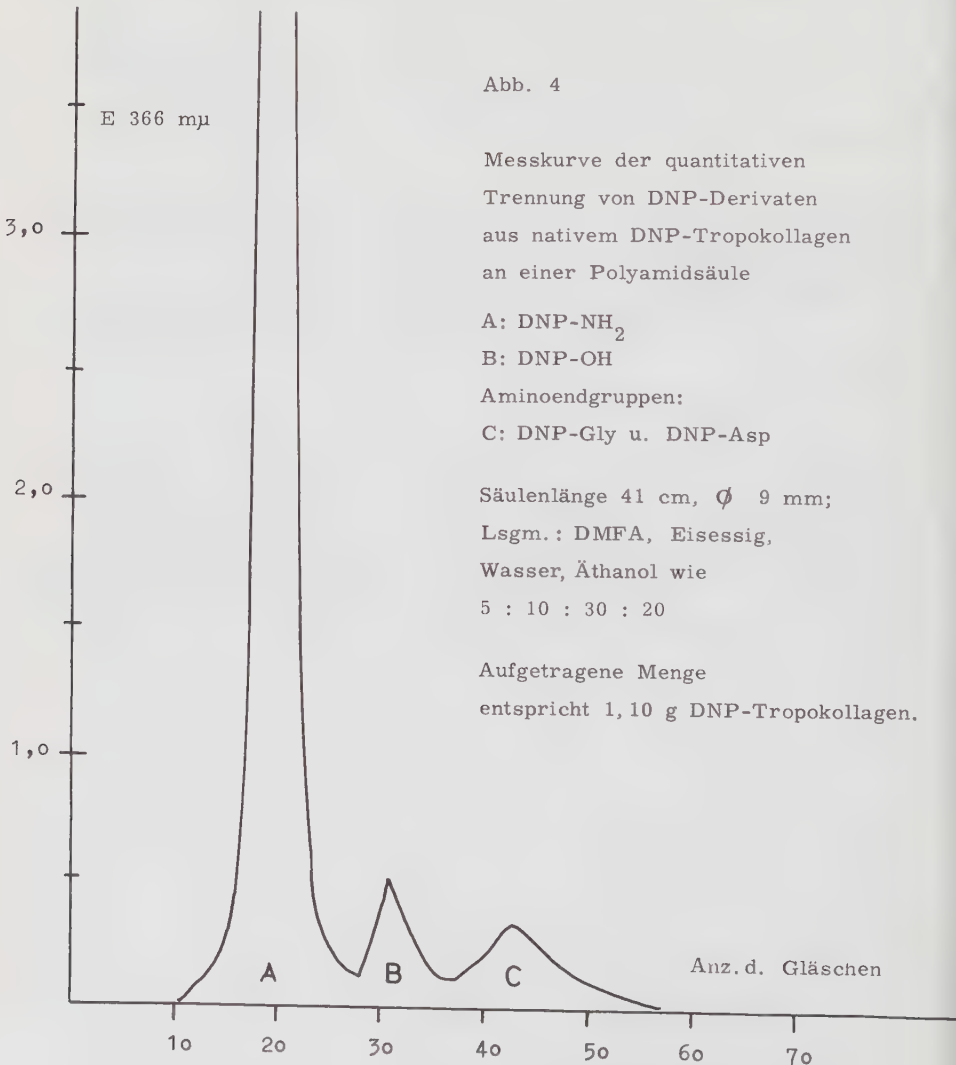
Lsgm.: DMFA, Eisessig,

Wasser, Äthanol wie

5 : 10 : 30 : 20

Aufgetragene Menge

entspricht 1,10 g DNP-Tropokollagen.



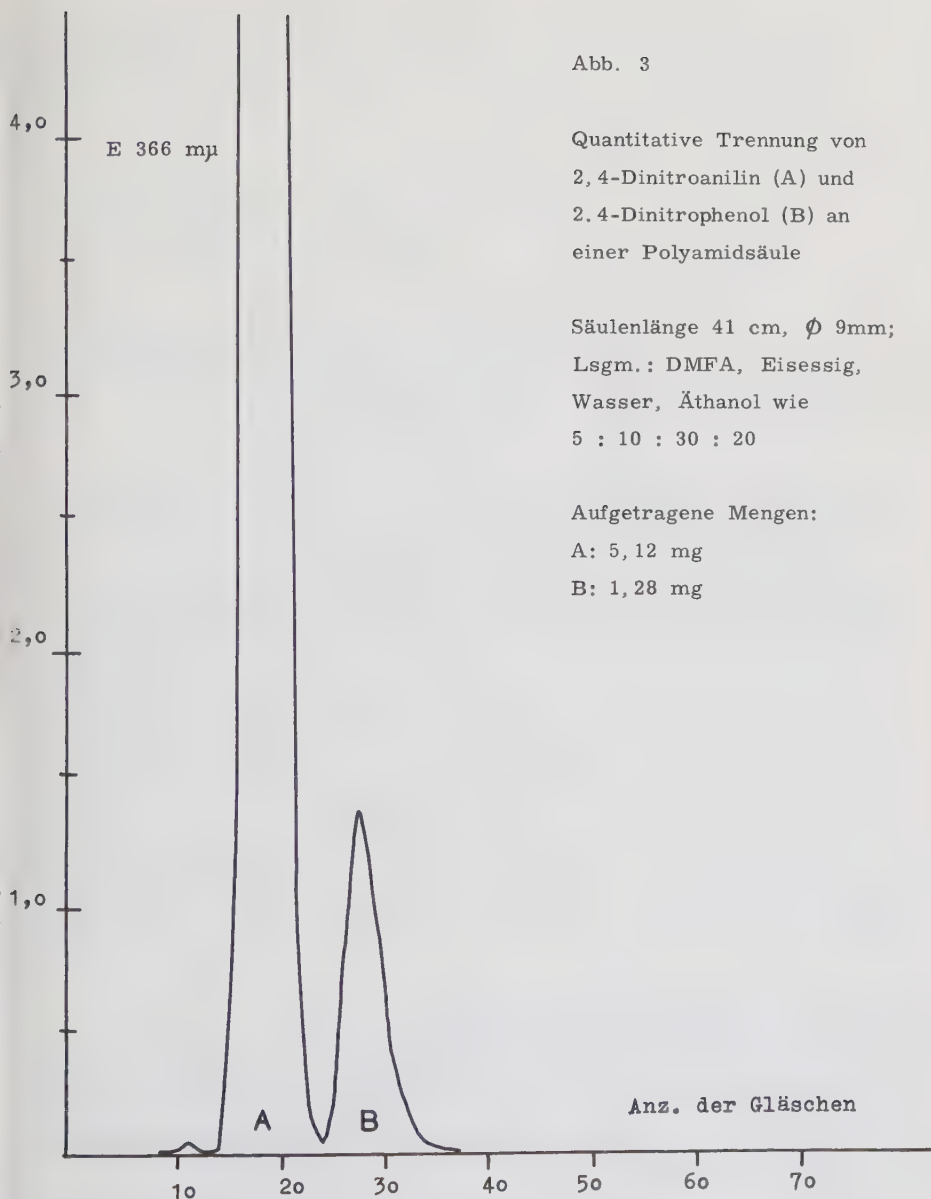


Abb. 3

Quantitative Trennung von
2,4-Dinitroanilin (A) und
2,4-Dinitrophenol (B) an
einer Polyamidsäule

Säulenlänge 41 cm, ϕ 9mm;
Lsgm.: DMFA, Eisessig,
Wasser, Äthanol wie
5 : 10 : 30 : 20

Aufgetragene Mengen:

A: 5,12 mg

B: 1,28 mg

Tab. 6

Molare Extinktionskoeffizienten (bei 366m μ) und Rf-Werte (an Ultramid BM) von DNP-Derivaten

Säulenlänge 41 cm, $\varnothing$ 9 mm;

Verbindung	Elutionsmittel	ϵ Mol ($1 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	Rf-Wert
DNP-NH ₂	Lösungsmittelgem. I DMFA: 5 Eisessig: 10 Wasser: 30 Äthanol: 20	$0,870 \cdot 10^4$	0,47
DNP-OH		$0,128 \cdot 10^4$	0,33
DNP-Asp		$1,182 \cdot 10^4$	0,24
DNP-Gly		$1,065 \cdot 10^4$	0,23
DNP-NH ₂	Eisessig	$0,680 \cdot 10^4$	
DNP-OH		$0,139 \cdot 10^4$	
DNP-NH ₂	ges. Bicarbonat	$0,891 \cdot 10^4$	
DNP-OH		$1,243 \cdot 10^4$	

Abb. 3 zeigt eine Trennung von DNP-NH₂ und DNP-OH, den beiden, in allen DNP-Protein-Hydrolysaten enthaltenen, schwer abtrennbaren Begleitsubstanzen. Die Abb. zeigt, dass die beiden DNP-Verbindungen im Lösungsmittelgem. I relativ rasch wandern. DNP-NH₂ läuft fast mit der Lösungsmittelfront.

waren u. a. zwei Lösungsmittelsysteme ausgearbeitet worden, die aus den gleichen Komponenten bestehen und sich nur durch deren mengenmässige Zusammensetzung unterscheiden. Es handelt sich dabei um ein weniger stark und ein stark eluierendes Lösungsmittelgemisch, dessen stärker eluierende Wirkung auf einem höheren Gehalt an DMFA und Eisessig beruht.

Lösungsmittelgemisch I (mittlere Elutionswirkung)

DMFA, Eisessig, Wasser, Äthanol

5 : 10 : 30 : 20

Lösungsmittelgemisch II (starke Elutionswirkung)

DMFA, Eisessig, Wasser, Äthanol

8 : 15 : 25 : 20

Das Lösungsmittelgemisch I kam im Verlauf dieser Arbeit zur Bestimmung der α -Amino-Endgruppen von Kollagen (Mono-DNP-Aminosäuren) zur Anwendung, während das Lösungsmittelgemisch II bei den in Teil VI 2. beschriebenen Trennungen von fester an Polyamid haftenden Bis-DNP-Aminosäuren verwendet wurde.

Zur Durchführung der säulenchromatographischen Trennung und quantitativen Endgruppenbestimmung, wurden die in wenig Äthanol (0,5 - 1,0 ml) gelösten DNP-Aminosäuren auf die Säulen aufgetragen und mit Lösungsmittelgemisch I eluiert. Nach Auffangen der Fraktionen im Fraktionssammler wurden die Extinktionen bei 366 m μ im Eppendorf-Kolorimeter (Medeor) gemessen. Zu diesem Zweck mussten zunächst die Extinktionskoeffizienten sowie die R_f-Werte der einzelnen Komponenten überprüft werden. Sie sind in Tab. 6 wiedergegeben.

Da sich bei der Hydrolyse relativ grosse Mengen an Dinitroanilin (DNP-NH₂) bilden, siehe Abb. 4 u. 6. und wie bereits erwähnt, eine quantitative Entfernung von Dinitrophenol (DNP-OH) nicht möglich war, mussten die Endgruppen neben DNP-NH₂ und DNP-OH bestimmt werden. Dies gelang auf Grund der Tatsache, dass, wie Tab. 6 zeigt, die R_f-Werte der auftretenden Komponenten weit genug auseinander liegen, um eine scharfe Trennung der einzelnen Fraktionen zu ermöglichen.

Aus den Werten in Tab. 5 A und B geht folgendes hervor:

Tab. 5 A.

1. DNP-Gly ist gegen saure Hydrolyse weniger resistent als DNP-Asp. Die Verluste betragen 35 bzw. 20 %.
2. Setzt man beide DNP-Aminosäuren gemeinsam den Bedingungen der Hydrolyse (2n HCl, 4 h am Rückfluss) aus, so beträgt der Gesamtverlust an beiden etwa 25 %.

Tab. 5 B.

3. Hydrolysiert man DNP-Asp bzw. DNP-Gly mit 0,5 g DNP-Kollagen, so verringern sich die Verluste um 15 - 20 %.
4. Hydrolysiert man beide DNP-Aminosäuren zusammen mit 0,5 g DNP-Kollagen, so beträgt der Verlust an beiden DNP-Aminosäuren etwa 15 % (Abb. 2).

Bei der Hydrolyse von DNP-Kollagen gemeinsam mit DNP-Asp und DNP-Gly wäre eigentlich eine Ausbeute von etwa 90 % zu erwarten (Mittel aus 86,9 und 96,4). Der Wert von 85 % konnte jedoch mehrfach bestätigt werden. Die auf das DNP-Kollagen entfallenden Mengen an DNP-Asp und DNP-Gly wurden, nachdem sie bestimmt worden waren, vor Berechnung der Ausbeuten für die in Tab. 5 aufgeführten Werte in Abzug gebracht.

c) Säulenchromatographie der DNP-Aminosäuren an Polyamid

Die im Verlauf dieser Arbeit zur quantitativen Bestimmung von Amino-Endgruppen an DNP-Kollagen verwendete Methode gründet sich auf die von Hörmann und v. Portatius (81) erarbeitete säulenchromatographische Trennung aromatischer Nitroverbindungen an Polyamid. Die Autoren hatten das chromatographische Verhalten verschiedener 2,4 - Dinitrophenylaminosäuren, - Peptide und anderer aromatischer Nitroverbindungen an Polycaprolactam in Dimethylformamid (DMFA), Eisessig, Wasser und Äthanol enthaltenden Lösungsmittelsystemen untersucht. Hierbei ergab sich eine Affinität aromatischer Nitroverbindungen zu Polyamid, die auf einer Antibasen-Basen-Wechselwirkung der Nitrogruppen mit den freien Amino-Endgruppen des Polymeren beruht und der Methode in gewissem Sinne den Charakter einer Ionenaustauschchromatographie gibt. Von den Autoren

Im Verlauf dieser Untersuchungen ergab sich sehr bald, dass in allen untersuchten Kollagenpräparaten nur DNP-Glycin und DNP-Asparaginsäure in quantitativ noch gut bestimmbar Mengen auftreten, während DNP-Glutaminsäure, DNP-Serin und DNP-Alanin je nach untersuchtem Material, nur in Spuren nachweisbar waren.

Zur Ermittlung der durch Hydrolyse bewirkten Verluste an DNP-Gly und DNP-Asp wurden beide DNP-Aminosäuren in einem Versuch jeweils einzeln, in einem zweiten Versuch gemeinsam den Bedingungen der Hydrolyse unterworfen. Schliesslich wurden DNP-Asp und DNP-Gly einzeln mit je 0,5 g DNP-Kollagen hydrolysiert und darauf beide DNP-Aminosäuren zusammen mit 0,5 g DNP-Kollagen. Das Ergebnis dieses letztgenannten Versuchs zeigt Abb. 2. In allen Fällen wurden die Ausbeuten durch Säulenchromatographie an Polyamid genau bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 5 wiedergegeben.

Tab. 5

Ausbeute an DNP-Gly und DNP-Asp nach Hydrolyse

A. Hydrolyse ohne Zusatz
von DNP-Kollagen
Hydrolysebedingungen:
4 h in 2nHCl am
Rückfluss

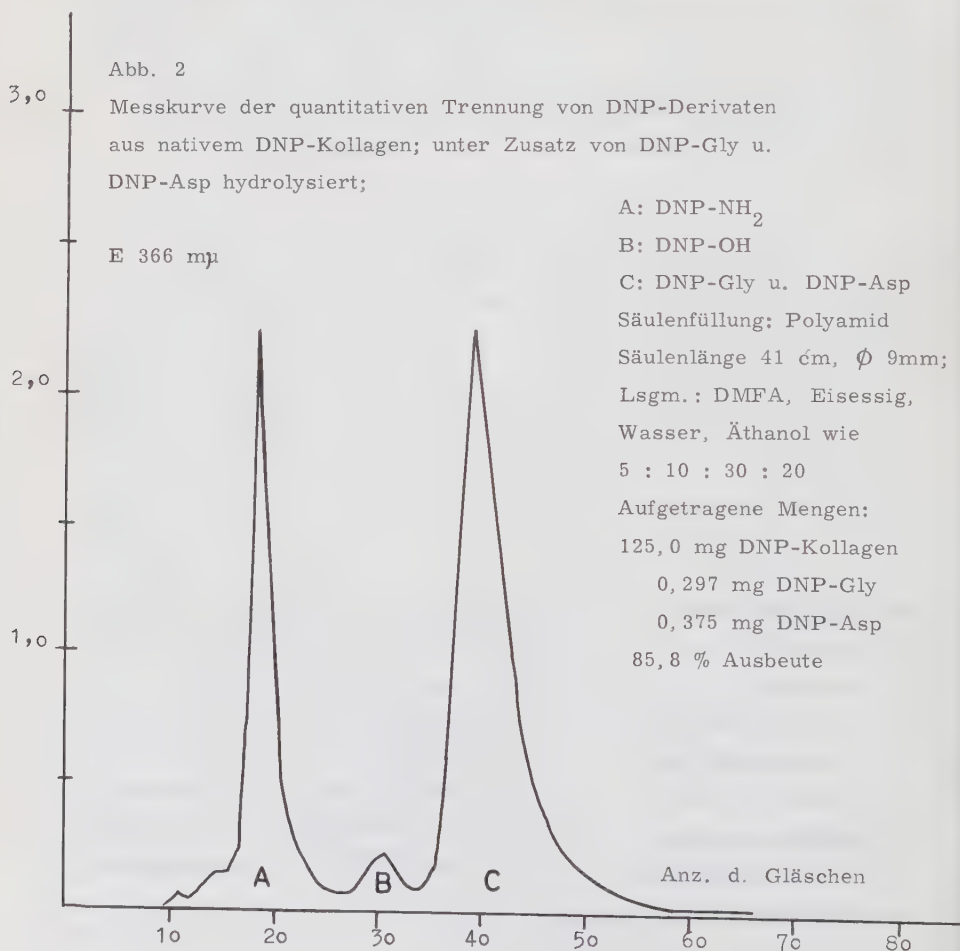
Ansatz	% Ausbeute
1,2mg DNP-Gly	64,2
1,5mg DNP-Asp	79,6
2,4mg DNP-Gly + 3,0mg DNP-Asp	74,2

B. Hydrolyse unter
Zusatz von DNP-
Kollagen
Hydrolysebedingungen:
4 h in 2n HCl am
Rückfluss, nach
Extraktion erneut
4 h in 6n HCl am
Rückfluss.

Ansatz	% Ausbeute
0,5g DNP-Kollagen + 1,5mg DNP-Asp 1,2mg DNP-Gly	85,8
0,5g DNP-Kollagen + 1,5mg DNP-Asp	96,4
0,5g DNP-Kollagen + 1,2mg DNP-Gly	86,9

Säure frei, wobei grössere Verluste vermieden wurden. Während der zweiten Stufe wurde dann der fester gebundene, wesentlich kleinere Anteil durch stärkere Säure abgespalten (Abb. 8).

Nach erneuter Extraktion des abgekühlten Hydrolysats wurden die Äther-extrakte vereinigt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels blieben die DNP-Aminosäuren zurück. Sie wurden durch Säulenchromatographie an Polyamid und zur vergleichenden Kontrolle durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel qualitativ und quantitativ bestimmt.



diesen Bedingungen quillt das Material sehr stark, geht jedoch im Gegensatz zu Tropokollagen nicht in Lösung.

Die Proben konnten nach erfolgter Umsetzung durch gründliches Auswaschen auf der Nutsche gereinigt werden. Zur Entfernung des DNP-OH konnte jedoch auch hier auf eine gründliche Extraktion mit Äthanol nicht verzichtet werden. Eine quantitative Entfernung des DNP-OH war, wie die Kurve Abb. 4 und Tab. 7, sowie das Dünnschichtchromatogramm Abb. 5 zeigen, in keinem Falle möglich.

Über die gleichen Schwierigkeiten bei der Abtrennung des DNP-OH berichtet Altenschöpfer (79) bei seinen Untersuchungen an DNP-Perlon sowie an DNP-Haut.

b) Schonende Hydrolyse in zwei Stufen

Die Hydrolyse des DNP-Kollagens sollte unter möglichst schonenden Bedingungen durchgeführt werden. Eine gewisse Labilität vieler DNP-Aminosäuren gegenüber saurer Hydrolyse ist seit langem bekannt und immer wieder beschrieben worden (46b). So finden sich in der Literatur zahlreiche Beispiele dafür, dass 2 - 24-stündige Hydrolyse in 6n HCl die Ausbeuten einiger Aminosäuren auf 0 - 20 % verringert hat (46b, 80). Es musste daher damit gerechnet werden, dass die Aminoendgruppen möglicherweise aus diesem Grunde im Kollagen bisher nicht nachgewiesen werden konnten (38, 48, 49).

Zur Hydrolyse der dinitrophenylierten Kollagenproben kam deshalb eine von Deasy (56) beschriebene 2-Stufen-Hydrolyse zur Anwendung, die im Verlaufe dieser Arbeit eingehend studiert wurde. So war vor allem zu klären, wie hoch die Verluste an DNP-Aminosäuren bei dieser Methode noch sind. Andererseits galt es festzustellen, ob diese Methode auch tatsächlich zu einer quantitativen Hydrolyse des DNP-Proteins führt.

Während der ersten Stufe wurden die Kollagenproben 4 h lang in 2n HCl am Rückfluss gekocht. Hierbei geht das DNP-Kollagen bereits während der ersten Min. in Lösung. Nach Abkühlen und gründlicher Extraktion mit Äther wurde die wässrige Phase mit konz. HCl auf 6n gebracht und erneut 4 h am Rückfluss erhitzt. Auf diese Weise wurde die Hauptmenge der leichter abspaltbaren dinitrophenylierten α -Aminoendgruppen in der ersten Stufe bei relativ kurzer Hydrolysezeit in sehr stark verdünnter

a) Umsetzung von nativem und denaturiertem Tropokollagen und Kollagen mit Dinitrofluorbenzol (DNFB)

Die Kollagenproben wurden in allen Fällen in wässrig-alkalischer Lösung bei pH 9,0 dinitrophenyliert.

Wie die in Teil II beschriebenen Ergebnisse gezeigt hatten, konnte durch Umsetzung in Gegenwart von 2,5 m NaClO_4 eine vollständige Substitution der ϵ -Aminogruppen erreicht werden. Um die α -Aminoendgruppen gleichfalls möglichst quantitativ erfassen zu können, wurde daher sowohl natives wie denaturiertes Tropokollagen und Kollagen mit DNFB umgesetzt.

α) Tropokollagen:

Zur Dinitrophenylierung des nativen Tropokollagens in homogener Lösung wurde es zunächst in Citratpuffer (pH 3,3) gelöst. Durch Zusatz von 4 m NaCl -Lösung wurde die Ionenstärke soweit erhöht, dass bei der anschliessenden Einstellung des pH-Wertes auf 9,0 mit 2 n NaOH ein Ausfallen des gelösten Materials verhindert werden konnte. Während des Verlaufs der Reaktion beginnt ein Teil des umgesetzten Tropokollagens allmählich auszufallen.

Nach erfolgter Dinitrophenylierung und Extraktion des überschüssigen DNFB wurden die Salze durch Dialyse entfernt. Die wässrige Suspension, die noch viel gelöstes DNP-Protein enthält, wurde anschliessend gefriertrocknet. Durch die Gefriertrocknung erhält man ein lockeres Material, was für eine Entfernung des durch Dinitrophenylierung im wässrigen Milieu in grossen Mengen gebildeten und zum Teil noch fest an der Faser haftenden Dinitrophenols (DNP-OH) durch Extraktion mit Äthanol von Vorteil ist.

In einem Parallelversuch wurde, wie in Teil II beschrieben, Tropokollagen zur Denaturierung in 2,5 m NaClO_4 gelöst, in Anwesenheit des Denaturierungsmittels dinitrophenyliert und in gleicher Weise aufgearbeitet.

β) Kollagen:

Die Umsetzung von reifem, nativem Kollagen mit DNFB erfolgte in einer 4%-igen NaHCO_3 -Lösung (pH 9,0), in der das Kollagen suspendiert wurde. Im Falle des denaturierten Kollagens wurde analog der Umsetzung von Tropokollagen in Gegenwart von 2,5 m NaClO_4 dinitrophenyliert. Unter

Ausbeute an ϵ -NH₂-Lysinpeptiden führen. Möglicherweise handelt es sich bei dem isolierten Lysinpeptid sogar um ein Artefakt, das bei der Gelatineherstellung entstanden sein könnte, indem veresterte Carboxylgruppen von Glutaminsäureresten mit nachbarständigen Aminogruppen unter Amidbildung reagiert hatten. Eine solche Amidierungsreaktion durch Estergruppen ist bei den alkalischen Bedingungen der Gelatineherstellung durchaus denkbar; sie steht in Analogie zur Reaktion von Estergruppen mit Hydroxylamin oder Hydrazin unter alkalischen Bedingungen, wobei sich Hydroxamsäuren oder Säurehydrazide bilden.

III. Methoden und Ergebnisse zur α -Aminoendgruppenbestimmung an Kollagen.

In der Einleitung war bereits darüber berichtet worden, dass die bisherigen Versuche, Aminoendgruppen im Kollagen nachzuweisen, keine positiven Ergebnisse gezeigt hatten. Viele dieser Versuche waren jedoch zu einem Zeitpunkt ausgeführt worden, zu dem über die Grösse des Tropokollagenmoleküls noch keine entsprechenden Angaben vorlagen. Seitdem jedoch aus Untersuchungen von Boedtker und Doty (3) sowie von Rich und Crick (4) bekannt ist, dass Tropokollagen einerseits ein Mol.-Gewicht von 360.000 besitzt und andererseits aus drei Peptidketten aufgebaut ist, ist klar geworden, dass es sich höchstens um sehr geringe Mengen an Endgruppen handeln kann, die möglicherweise bei den bisher angewendeten Methoden nicht erfasst worden sind. Es stellte sich daher die Aufgabe, die Bestimmung der Aminoendgruppen erneut zu überprüfen und zwar mit einer entsprechend empfindlichen Methode, die auch Mengen von einem Mol pro 1.000 Mol Aminosäuren mit Sicherheit zu erfassen gestattet.

Im folgenden sei zunächst die Bestimmungsmethode näher ausgeführt.

I. Methoden

Die Aminoendgruppen des Kollagens wurden nach der DNP-Methode von Sanger (46) bestimmt. Um das Verfahren entsprechend empfindlich zu machen, mussten für sämtliche Reaktionsschritte - Dinitrophenylierung, Hydrolyse, chromatographische Trennung der DNP-Aminosäuren - optimale Bedingungen entwickelt werden.

einer erheblichen Quellung begleitet ist, wird die Proteinstruktur zerstört. Auf diese Weise wird offenbar auch der im nativen Material nicht substituierbare Anteil an freien ϵ -Aminogruppen einer Dinitrophenylierung zugänglich gemacht.

Widersprechende Ergebnisse anderer Autoren, z.B. der bereits erwähnten Untersuchungen von Bowes und Moss (38), die nur 55 - 60% der

ϵ -Aminogruppen des Lysins mit Dinitrofluorbenzol umsetzen konnten, mögen darauf zurückzuführen sein, dass sie eine Renaturierung der denaturierten Produkte während der Reaktion nicht ganz vermeiden konnten.

Auf Grund der Tatsache, dass die ϵ -Aminogruppen des Kollagens unter geeigneten Bedingungen vollständig dinitrophenyliert werden, darf man schliessen, dass sie an Quervernetzungen nicht in nennenswertem Umfang beteiligt sein können. Sollte es sich allerdings um eine Vernetzung durch sehr geringe Mengen an Lysin oder Hydroxyl-Lysin handeln, etwa in der Grössenordnung von einem Mol pro 1.000 Mol Aminosäuren, dann ist die Genauigkeit der angewendeten Methode überfordert. Wie man aus Tabelle 4 ersehen kann, werden nach Hydrolyse der DNP-Proteine von allen untersuchten in den Seitenketten durch Dinitrofluorbenzol substituierbaren Aminosäuren noch Mengen in der Grössenordnung von 0,1 Mol pro 100 Mol Aminosäuren in freier Form festgestellt. Diese geringen Anteile, die an der Grenze des Erfassbaren liegen, stammen wahrscheinlich von einer geringen Spaltung der DNP-Verbindungen während der Hydrolyse.

Schliesslich wäre noch der Befund von Mechanic und Levy (40) zu diskutieren, nach dem aus sauren Partialhydrolysaten von Gelatine N ϵ -(Glycyl- α -glutamyl-)Lysin gewonnen worden war. Das Vorhandensein dieses Peptides würde dafür sprechen, dass ϵ -Aminogruppen des Kollagens an Quervernetzungen beteiligt sind. Die Menge des isolierten Peptides entspricht aber weniger als 0,03 Mol Lysin pro 100 Mol Aminosäuren. Aus Untersuchungen an Bacitracin A (78) ist bekannt, dass die von ϵ -Aminogruppen des Lysins ausgehenden Peptidbindungen gegen saure Hydrolyse ausserordentlich beständig sind. Wenn daher ein grösserer Teil der im Kollagen enthaltenen ϵ -Aminogruppen des Lysins tatsächlich an derartigen Bindungen beteiligt wäre, sollte die Aufarbeitung zu einer weit grösseren

phenylierten Proben und des Ausgangsmaterials gleichgesetzt (siehe dazu die Ausführungen im Text S. 34).

Aus Tab. 4 geht hervor, dass in Tropokollagen und Kollagen noch bestimmte Mengen an Lysin und Hydroxylysin nachweisbar sind, wenn die Dinitrophenylierung unter nativen Bedingungen durchgeführt wurde. Dieser Anteil ist im nativen Protein einer Dinitrophenylierung offenbar nicht zugänglich. Nach Umsetzung in Gegenwart von 2,5 n NaClO_4 finden sich nur noch sehr kleine Mengen an Lysin und Hydroxylysin im Hydrolysat. Die nach der Methode von Moore und Stein (69)⁺ ermittelten Werte liegen an der Grenze einer sicheren Erfassung.

Das bedeutet, dass die Fehlbeträge von 30% und mehr (38, 39) sicher vorgetäuscht sind. Andererseits kann das Vorliegen kleinster Mengen von Quervernetzungen, die auf das physikalische Verhalten unter Umständen von grossem Einfluss sein können, nicht ausgeschlossen werden.

Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit der ϵ -Aminogruppen in Tropokollagen und Kollagen in Gegenwart von 2,5 m NaClO_4 wurden nicht beobachtet.

Diese Befunde sprechen gegen eine entscheidende Beteiligung von ϵ -Aminogruppen an hauptvalenzmässigen Quervernetzungen zwischen Tropokollagenmolekülen.

2. Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, dass die ϵ -Aminogruppen von Tropokollagen und Kollagen in freier Form vorliegen. Sie können am denaturierten Protein vollständig substituiert werden. Am nativen Material dagegen ist eine quantitative Substitution erschwert. Zu ähnlichen Resultaten kam Gallop (76), der zeigen konnte, dass durch Guanidierung von nativem Ichthyocoll 87% des Lysins, bei der Umsetzung von hitzedenaturiertem Ichthyocoll dagegen 94% des Lysins in Homoarginin übergeführt werden. Durch die Denaturierung des Kollagens, die von einer Sprengung der Wasserstoffbrückenbindungen sowie im Falle des reifen Kollagens von

⁺ Apparatur nach der Modifikation von K. Hannig

für die eingesetzte Kollagenmenge verwenden. Diese Bezugsmethode ist wesentlich günstiger als eine Berechnung auf die Einwaage, nachdem das substituierte Kollagen gewichtsmässig nicht ohne weiteres mit dem unbehandelten verglichen werden kann und eine N-Bestimmung wegen der eingeführten DNP-Reste keine verlässlichen Werte liefert.

Möglicherweise waren die von den verschiedenen Autoren mitgeteilten Werte über die Substituierbarkeit der Aminosäuren des Kollagens darauf zurückzuführen, dass im nativen Kollagen ein Teil dieser Gruppen maskiert vorliegt und erst beim Denaturieren zugänglich wird. Um diese Möglichkeit auszuschliessen, wurde versucht, die ϵ -Aminogruppen von reifem Kollagen und von Tropokollagen vor und nach Denaturierung, bei pH 9,0 mit Dinitrofluorbenzol umzusetzen. Um eine Renaturierung des denaturierten Materials während der Umsetzung zu vermeiden, wurde in 2,5 m NaClO_4 -Lösung dinitrophenyliert. Unter diesen Bedingungen geht das Tropokollagen in Lösung, um erst nach beendeter Dinitrophenylierung zum Teil wieder auszufallen. Reifes Kollagen bleibt dagegen ungelöst.

Tab. 4

Analyse der basischen Aminosäuren von unbehandeltem und dinitrophenyliertem Prokollagen und Kollagen. Angaben in Mol/100 Mol Aminosäuren.

	His	Lys	Hylys	Arg ⁺⁾
Tropokollagen				
unbehandelt	0,65	2,88	0,50	5,45
nativ dinitrophenyliert.....	0,23	1,26	0,22	5,45
in 2,5 m NaClO_4 dinitrophenyliert...	0,08	0,07	0,08	5,45
Kollagen				
unbehandelt.....	0,60	2,70	0,55	5,35
nativ dinitrophenyliert.....	0,06	0,27	0,11	5,35
in 2,5 m NaClO_4 dinitrophenyliert..	0,15	0,10	0,12	5,35

^{+) Zur Berechnung der Werte wurde der Arginingehalt der dinitro-}

Bedeutung bei der Diskussion der chemischen Natur der Quervernetzungen des Kollagens zu. Sind alle ϵ -Aminogruppen Substitutionsreaktionen zugänglich, dann kann man ausschliessen, dass sie an den Vernetzungen beteiligt sind, etwa durch Ausbildung von Amidbindungen mit ω -Carboxylgruppen von Asparagin- und Glutaminsäureresten benachbarter Peptidketten.

Über die Zugänglichkeit der ϵ -Aminogruppen liegen sehr unterschiedliche Befunde vor. So fanden Bowes und Moss (38), dass nur 55 - 60% der

ϵ -Aminogruppen des Lysins mit Dinitrofluorbenzol reagieren. Levy, Fishman und Cabrera (39) behandelten Sehnenkollagen mit Nitrosylchlorid und stellten fest, dass 35% der ϵ -Aminogruppen des Lysins intakt blieben, also nicht in freier Form vorliegen sollten, während der Rest zerstört wurde. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu denen anderer Autoren (75, 76, 77, 10b), die fanden, dass die ϵ -Aminogruppen des Lysins im Kollagen in weit höherem Masse Substitutionsreaktionen zugänglich sind.

Für eine geringe Substitution der ϵ -Aminogruppen im Kollagen spricht die Tatsache, dass Mechanic und Levy (40) aus sauren Partialhydrolysaten von Gelatine die Isolierung des Peptids N^{ϵ} -(-Glycyl- α -glutamyl-) lysin gelang. Die Ausbeute entsprach jedoch weniger als einem Prozent des Lysinanteils des Kollagens, das sind weniger als 0,03 Mol Lysin pro 100 Mol Aminosäuren.

1. Restbasenbestimmung an dinitrophenyliertem nativem und denaturiertem Tropokollagen und Kollagen.

Als einfacher quantitativ exakt durchführbarer Weg zur Klärung der Zugänglichkeit der ϵ -Aminogruppen für Substitutionsreaktionen bot sich die Möglichkeit an, Tropokollagen oder Kollagen mit Dinitrofluorbenzol umzusetzen und im Reaktionsprodukt nach saurer Hydrolyse freies Lysin und Hydroxylysin quantitativ zu bestimmen. Führt man diese Bestimmung im Aminosäureanalysator durch, in dem die basischen Aminosäuren an einer kleineren Kationenaustauschersäule getrennt analysiert werden, dann kann man den gleichzeitig mitgemessenen Arginingehalt des Materials, der durch die Dinitrophenylierung nicht beeinflusst wird, als Bezugswert

Ansteigen der Schrumpfungstemperatur um etwa 5 - 6°. Das kann durch eine Vernetzung der Peptidketten durch die bifunktionellen Reagentien erklärt werden. Reduktion der Disulfid-Quervernetzungen machte diesen Effekt in beiden Fällen rückgängig. Eine Erhöhung der Schrumpfungstemperatur um einen ähnlichen Betrag wurde von Zahn (71) auch bei der Vernetzung von Kollagen mit Difluordiphenylsulfon beobachtet. Neben einer bevorzugten monofunktionellen Reaktion fand demnach bei all diesen Umsetzungen in geringerem Umfang auch ein bifunktioneller Angriff statt. Offenbar liegt nur ein bestimmter Teil der ϵ -Aminogruppen des Kollagens in einer für Vernetzungen günstigen sterischen Lage vor.

Nachdem es gelungen war, Kollagen mit SH-gruppenhaltigen Substituenten zu besetzen, erhob sich die Frage, ob es möglich ist, diese Gruppen nach Beladen mit Schwermetallen elektronenmikroskopisch zu lokalisieren. Veränderungen im elektronenmikroskopischen Bild der thioglykolatsubstituierten Kollagenproben wären nach Einlagerung von Ag- oder Pb-Salzen vor allem in den a-Streifen zu erwarten gewesen; in diesen sind wie die Arbeiten von Kühn (10f) gezeigt haben, basische Aminosäuren besonders stark angereichert. Leider erwiesen sich die Effekte als zu gering, um deutliche Unterschiede zwischen den Präparaten vor und nach Behandlung mit Blei- oder Silbersalzen zu erkennen. Es ist jedoch zu erwarten, dass es mit Hilfe von Röntgenstrukturuntersuchungen gelingt, die neu eingeführten Schwermetallatome zu lokalisieren.

Möglicherweise ist das Ausbleiben einer Intensitätssteigerung bestimmter Querstreifen nach Beladen von Thioglykolatkollagen mit Ag- oder Pb-Salzen darauf zurückzuführen, dass diese Schwermetalle den Ordnungszustand der Fibrillen wegen ihrer geringen Wertigkeit nicht zu verbessern vermögen. Eine solche Wirkung ist für das Zustandekommen einer gut ausgebildeten Querstreifung wesentlich, wie bereits auf Seite 3 ausgeführt wurde.

II. Zur Frage der Beteiligung von ϵ -Aminogruppen an der Quervernetzung

Im vorliegenden Kapitel war die Frage zu klären, ob alle ϵ -Aminogruppen des Tropokollagens und Kollagens in freier Form vorliegen oder ob nicht vielleicht ein Teil davon substituiert ist. Dieser Frage kommt eine grosse

Die Reduktion der nach den beiden Verfahren eingeführten Disulfidgruppen mit Hilfe von Thioglykolsäure verlief glatt. Im Falle des mit dem bifunktionellen Säurechlorid substituierten Kollagens ergaben sich bei der Reduktion Veränderungen in der Schrumpfungstemperatur, wie sie nach Ergebnissen anderer Autoren (siehe unten) zu erwarten waren. Die Einführung SH-haltiger Substituenten in Kollagen ist somit als gelöst anzusehen. In diesen untersuchten Fällen hatten etwa 75% der ϵ -Aminogruppen reagiert.

In diesem Zusammenhang mögen drei Arbeiten Erwähnung finden, in denen - wenn auch mit anderem Ziel - gleichfalls die Einführung von Sulfhydrylgruppen in Proteine beschrieben wird. So gelang es Schöberl (72) durch Umsetzung von Polythioglykoliden, die durch Kondensation von Thioglykolsäure unter Wasserabspaltung entstehen, mit löslichen Eiweißstoffen (Ovalbumin, Casein) die ϵ -Aminogruppen unter Einführung von Thioglykolsäureresten zu substituieren.

Klotz und Heiney (73) haben zum gleichen Zweck das S-Acetyl-Mercaptobernsteinsäureanhydrid verwendet. In diesem Falle muss allerdings die Einführung einer zusätzlichen Carboxylgruppe in Kauf genommen werden. Die Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppe wurde durch verdünnte NaOH bei pH 11,5 innerhalb weniger Minuten erreicht.

Über sehr ähnliche Resultate wie sie in der vorliegenden Arbeit beschrieben sind, berichteten nach dem experimentellen Abschluss meiner Untersuchungen (siehe dazu Bericht über die Diplomarbeit vom 28.4.1961) Schade und Zahn (74). Den Autoren war es gelungen, Sehnenkollagen mit dem Bis-*o*-nitrophenylester von Bis-carbobenzoxycystin umzusetzen. Das isolierte Produkt enthielt 5,5 %Schwefel entsprechend 1,1 mMol Disulfidbindungen/g Kollagen. Diese Menge ist wesentlich grösser als sie einer Substitution der ϵ -Aminogruppen (0,315 mMol/g) entsprechen würde. Möglicherweise wurden bei dieser Reaktion auch Imidazolylreste und Hydroxylgruppen in den Seitenketten des Kollagens substituiert.

Sowohl die Reaktion von Schade und Zahn mit dem bifunktionell aktivierten Cystinderivat als auch die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Umsetzung von Kollagen mit Dithiodiglykolsäure-Dichlorid führten zu einem

säure-Dichlorid und das bisher noch unbekannte cyclische Anhydrid der Dithiodiglykolsäure eingesetzt. Beide erwiesen sich als brauchbar, wenn auch bei der Acylierungsreaktion besondere Schwierigkeiten zu überwinden waren.

Modellversuche hatten bereits gezeigt, dass die beiden Reagentien sehr labil waren, sowohl gegen Spuren von Wasser als auch gegen tertiäre Amine wie Pyridin oder Triäthylamin, die üblicherweise zur Bindung der Säure, welche bei der Acylierung frei wird, angewendet werden. Tertiäre Basen führten zur Bildung dunkel gefärbter harziger Produkte. Wurde dagegen das primäre Amin, welches acyliert werden sollte, im Überschuss angewandt, um auch die frei werdende Säure zu binden, dann liess sich die Reaktion glatt durchführen.

Zur Substitution der Aminogruppen des Kollagens musste nach diesen Erfahrungen ein besonderer Weg eingeschlagen werden. Im Falle der Verwendung von Dithiodiglykolsäure-Dichlorid gelang eine Substitution ohne Bildung harziger Nebenprodukte, indem zur ätherischen Suspension ein Überschuss an Säurechlorid zugetropft und die entstehende Säure mit methanolischer KOH in dem Masse abgefangen wurde, in dem sie sich bildete. Unter diesen Bedingungen wurden die ϵ -Aminogruppen zu etwa 75% substituiert, wobei das Acylierungsmittel zur Hauptsache monofunktionell in geringem Masse aber auch bifunktionell mit den ϵ -Aminogruppen des Kollagens reagiert hatte. Dies ging aus den Ergebnissen der anschliessenden Reduktion hervor.

Cyclisches Dithiodiglykolsäure-Anhydrid liess sich nach dem gerade beschriebenen Weg wegen seiner hohen Empfindlichkeit mit Kollagen nicht umsetzen. Eine Substitution gelang jedoch, als triäthylamin-vorbehandeltes Kollagen, in welchem die ϵ -Aminogruppen in entladenerem Zustand vorliegen und die Carboxylgruppen durch Triäthylamin abgesättigt sind, mit dem Anhydrid zur Reaktion gebracht wurde. Die entstehende freie Säure wurde entweder durch einen Teil der Aminogruppen des Kollagens oder durch anhaftendes Triäthylamin gebunden. Nach dreimaliger Durchführung der Reaktion jeweils nach erneuter Triäthylaminbehandlung waren 75 % der ϵ -Aminogruppen acyliert.

cyclischen Dithiodiglykolsäure-Anhydrid umgesetzten Proben. EM-Aufnahme Nr. IV zeigt das acylierte, unreduzierte, EM-Aufnahme Nr. V das reduzierte Produkt nach "Anfärbung" mit PWS und Uranylacetat (UAc). Bei dem reduzierten und mit Silber beladenen Präparat konnte eine gute Unterteilung und Schärfe der Querstreifung (7-8 Streifen pro Periode) nur durch eine "Anfärbung" mit PWS und UAc erreicht werden (EM-Aufnahme Nr. V a). Zusätzliche Effekte durch den Einbau von Silber und Blei in die basischen Bereiche der Faser waren demnach entgegen den Erwartungen die zur Bearbeitung dieses Themas geführt haben, nicht zu verzeichnen. Offenbar ist die Wirkung der eingelagerten Schwermetallatome noch zu gering, um elektronenmikroskopisch erkannt werden zu können. Eine Schädigung der nativen Faser durch die Bedingungen der Acylierungsreaktion wurde in keinem Falle beobachtet.

4. Diskussion der Ergebnisse

Die Einführung von SH-gruppenhaltigen Substituenten in Kollagen wurde mit drei verschiedenen Acylierungsmitteln versucht. Diese sollten mit den ϵ -Aminogruppen des Kollagens zur Reaktion gebracht werden. Der erste Weg bestand in der Verwendung von S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid. Nach erfolgter Substitution sollte die S-Benzylgruppe durch Natrium in flüssigem Ammoniak abgespalten und damit die SH-Gruppe freigelegt werden. Modellversuche mit n-Butylamin hatten gezeigt, dass eine Substitution von Aminogruppen mit dem Säurechlorid bereits oberhalb pH 7 mit guter Ausbeute durchführbar ist. Am Kollagen gelang in Pyridinsuspension eine quantitative Substitution der ϵ -Aminogruppen, wie aus einer Bestimmung des eingeführten Schwefels (0,39 mMol/g) hervorgeht. Es erwies sich dann aber als undurchführbar, die S-Benzylgruppen des modifizierten Kollagens abzuspalten, da sich das Protein unter Einwirkung von Natrium in flüssigem Ammoniak zersetzt. Nachdem dieser Weg versperrt war, wurde der Versuch unternommen, disulfidhaltige Acylierungsmittel einzusetzen und nach erfolgter Substitution durch Reduktion freizulegen. Als Acylierungsmittel wurden Dithiodiglykol-

stimmt gut mit der Vorstellung überein, dass von dem monofunktionellen Dithiodiglykolsäure-Anhydrid nach Reaktion mit einer ϵ -Aminogruppe des Kollagens, durch die Reduktion der Disulfidbindung ein Molekül Thioglykolsäure abgespalten wird.

d) Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Fibrillen aus Sehnenkollagen, dessen ϵ -Aminogruppen durch Acylierung mit S-Benzyl-Thioglykolsäure-chlorid blockiert worden waren, ergab nach "Anfärbung" mit Phosphorwolframsäure (PWS) eine hochunterteilte Querstreifung, wie sie von Kühn (10b) auch an Acetylkollagen beobachtet wurde (EM-Aufnahme Nr. I)⁺. Die Perioden von 640 Å Länge liessen sich in 7 - 8 Querstreifen auflösen. Eine zur Einführung von Schwermetallen erforderliche Abspaltung der SH-Schutzgruppe am nativen Material war, wie berichtet, nicht möglich.

EM-Aufnahme Nr. II zeigt Fibrillen des mit Dithiodiglykolsäure-Dichlorid umgesetzten Kollagens vor der Reduktion der Disulfidbrücken nach "Anfärben" mit PWS. Eine Verbesserung des Querstreifungsmusters durch eingeführte Disulfidbrücken war nicht zu beobachten. Offenbar reicht der Anteil an zusätzlich eingeführten Vernetzungen zwischen den ϵ -Aminogruppen nicht aus, um eine Fixierung oder gar Verbesserung des in der Fibrille bereits vorgegebenen Ordnungszustandes in der EM-Aufnahme sichtbar werden zu lassen. Das Bild zeigt eine deutliche, normale, wenn auch nicht hochunterteilte Querstreifung. Bei einem frisch reduzierten, in der SH-Form vorliegenden, nicht "angefärbten" Präparat (EM-Aufnahme Nr. III), erkennt man eine zwar verschwommen erscheinende, aber durchaus normale Querstreifung, wie sie auch für unbehandeltes Kollagen charakteristisch ist. EM-Aufnahme Nr. III a zeigt das gleiche Produkt nach "Anfärbung" mit PWS.

Ein Vergleich der EM-Aufnahme Nr. III mit Aufnahme Nr. III b und Nr. III c lässt erkennen, dass eine Behandlung des reduzierten, in der SH-Form vorliegenden Präparates mit 2%-igen Lösungen von Silbernitrat (Nr. III b) bzw. Bleiacetat (Nr. III c) keine Intensivierung des a-Streifens - in welchem nach Kühn (10f) die basischen Aminosäuren besonders stark angereichert sind - zur Folge hatte.

Ähnliche Verhältnisse ergaben sich bei der Untersuchung der mit dem

⁺ EM-Aufnahmen siehe Teil VII. S. 98

Diese Ergebnisse lassen darauf schliessen, dass zur Hauptsache eine monofunktionelle Reaktion stattgefunden hat, wobei insgesamt etwa drei Viertel aller substituierbaren Basen mit dem Säurechlorid reagiert haben. Eine gewisse Menge an bifunktionell gebundenem Reagens muss jedoch angenommen werden, da die Erhöhung des Schrumpfungspunktes um 6°C nur auf neu eingebaute Quervernetzungen zurückgeführt werden kann. Nach Spaltung der Disulfidbrücken durch Reduktion ging der Schrumpfungspunkt auf den im Ausgangsmaterial bestimmten Wert zurück.

c) Umsetzung von Sehnenkollagen mit Dithiodiglykolsäure-Anhydrid

Bei der Umsetzung von Sehnenkollagen mit dem Anhydrid der Dithiodiglykolsäure musste erneut die hohe Reaktionsfähigkeit disulfidhaltiger Acylierungsmittel beachtet werden. Im vorliegenden Fall wurde die Reaktion in absolutem Aceton durchgeführt. Zur Bindung der bei der Reaktion frei werdenden Säure wurde Triäthylamin verwendet, doch durfte davon nur eine sehr geringe Menge eingesetzt werden, um eine Verharzung des cyclischen Anhydrids zu verhindern. Es wurde daher das Triäthylammoniumsalz des Kollagens verwendet, welches 20 Stunden mit einer Lösung von Dithiodiglykolsäure-Anhydrid behandelt wurde. Nach gründlichem Auswaschen des Produktes mit organischen Lösungsmitteln wurde die Umsetzung unter gleichen Bedingungen noch zweimal wiederholt. Durch Vermeidung grösserer Mengen Triäthylamin konnte auf diese Weise die Nebenreaktion fast ganz ausgeschaltet werden. Sie machte sich lediglich durch eine schwache Braunfärbung des Reaktionsgemisches bemerkbar. Durch die dreimalige Umsetzung sollte eine möglichst quantitative Substitution der basischen Gruppen erzielt werden.

Das Produkt wurde gründlich mit Phosphatpuffer (pH 8,5), Wasser, Aceton, Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Eine Analyse ergab, dass 1,69 % S neu eingeführt worden waren (Tab. 3). Dies entspricht einer etwa 75%-igen Substitution der ϵ -Aminogruppen des Kollagens.

Nach Reduktion des Produktes mit Na-Thioglykolat und gründlichem Auswaschen war der S-Gehalt auf 0,86 % gesunken. Diese Abnahme des S-Gehaltes um etwa die Hälfte der ursprünglich eingeführten Menge

2. a) β) beschriebenen Bedingungen und nach gründlichem Auswaschen sank der Gehalt an neu eingeführtem S von 1,09% auf 0,66%, während der Schrumpfungspunkt auf 67° C zurückging.

Tab. 3

Schwefelgehalt und Schrumpfungspunkte thioglykoly-substituierter Präparate von Sehnenkollagen

Behandlung von Sehnenkollagen	Gesamt-S %	S neu eingeführt %	berechnete Menge S (bei quantitativer Substitution %)	mMol S neu eingeführt pro Gramm Kollagen	TS
Kontrolle (unbehandelt)	0,32	-	-	-	66°
S-Benzyl-Thioglykolsäure-Chlorid in Pyridin	1,40	1,08	1,04	0,39	60°
Dithiodiglykolsäure-Dichlorid in methanol. KOH	1,41	1,09	1,12 ⁺ 2,24 ⁺⁺	0,39	72°
-----	-----	-----	-----	-----	-----
anschliessend reduziert mit Thioglykolat	0,98	0,66	1,12	0,20	67°
Dithiodiglykolsäure-Anhydrid in Triäthylamin	2,01	1,69	2,24	0,53	68°
-----	-----	-----	-----	-----	-----
anschliessend reduziert mit Thioglykolat	1,18	0,86	1,12	0,27	60°

⁺ bei quantitativer bifunktioneller Reaktion

⁺⁺ bei quantitativer monofunktioneller Reaktion

tertiären Aminen wie Triäthylamin oder Pyridin als HCl-bindendes Mittel wegen der zu Nebenprodukten führenden Reaktion zwischen Base und Säurechlorid nicht möglich war.

Um diese Störung zu umgehen, wurde das in abs. Äther suspendierte Kollagen unter langsamem Zutropfen von 0,5 normaler methanolischer Kalilauge mit dem gleichfalls in kleinen Portionen zugesetzten Dithiodiglykolsäure-Dichlorid bei pH 9,0 umgesetzt.

Bei Verwendung von methanolischer Kalilauge als Base war zwar wegen des im Gleichgewicht vorhandenen Alkoholats mit einer teilweisen Veresterung des Alkohols durch das im Überschuss eingesetzte Säurechlorid zu rechnen. Im vorliegenden Falle konnte jedoch mit Sicherheit angenommen werden, dass die Acylierungsreaktion zwischen ϵ -Aminogruppe und Säurechlorid die raschere und damit bevorzugte Reaktion sein würde. Eine Analyse des Produktes ergab, dass 1,09 % S neu eingeführt worden waren (Tab. 3). Gleichzeitig hatte sich der Schrumpfungspunkt um 6° erhöht. Im Gegensatz zu unbehandeltem Kollagen quoll das Produkt nicht mehr in 0,5 %-iger Essigsäure.

Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass das bifunktionelle Säurechlorid durch Reaktion mit ϵ -Aminogruppen, welche zwei verschiedenen Polypeptidketten des Kollagens angehören, zur Ausbildung von Quervernetzungen befähigt ist. Bei quantitativer bifunktionaler Reaktion sollte die zusätzlich eingeführte Schwefelmenge 1,12 % betragen. Für quantitative monofunktionelle Reaktion wurde ein Wert von 2,24 % errechnet. Die Zahlen gelten unter der Voraussetzung, dass sämtliche substituierbaren Basen mit dem Säurechlorid reagiert haben. Um einen Anhaltspunkt über das Ausmass von Mono- und Bisubstitution zu gewinnen, wurden die Disulfidbindungen reduziert. Wenn alle Dithiodiglykolsäurereste in bifunktionaler Bindung vorliegen, sollte sich bei der Reduktion der Schwefelgehalt des substituierten Kollagens nicht ändern. Waren dagegen alle Dithiodiglykolsäurereste monofunktionell gebunden, dann sollte der Schwefelgehalt des Kollagens bei der Spaltung der Disulfidbindungen auf die Hälfte absinken.

Nach Reduktion des Produktes mit Na-Thioglykolat unter erprobten, bei

nicht gedeckt. Die Differenz wird auf im Sehnenkollagen enthaltenes Chondroitinsulfat zurückgeführt (H. Zahn) (71). Eine Bestimmung des anorganischen Schwefels ergab einen Gehalt von 0,04%.

a) Umsetzung von Sehnenkollagen mit S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid

In Pyridin suspendiertes Sehnenkollagen wurde 24 Stunden lang mit einem grossen Überschuss an S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid behandelt. Wegen der Unlöslichkeit des Säurechlorids in wässrigem Milieu wurde die Umsetzung mit Kollagen - analog der unter 2. a) α) beschriebenen Umsetzung mit der Modells substanz n-Butylamin - in Pyridin statt in alkalischer Pufferlösung ausgeführt. Dies war schon deshalb erforderlich, weil es sich hierbei um ein heterogenes System handelt, in welchem das Kollagen in fester Form vorliegt.

Das gründlich ausgewaschene Produkt wurde zur Entfernung der letzten Reste an S-haltigen Verunreinigungen durch Suspendieren in verd. NaHCO_3 -Lösung, verd. Essigsäure sowie organischen Lösungsmitteln bei Zimmertemperatur extrahiert.

Die Schwefelanalyse ergab, dass 1,08% S neu eingeführt worden waren. Dies entspricht ziemlich genau einer quantitativen Substitution aller ϵ -Aminogruppen des Lysins und Hydroxylysins (s. Tab. 3). Der Schrumpfungspunkt des Produktes war von 66°C (unbehandeltes Sehnenkollagen) auf 60°C gefallen.

Bei dem Versuch, den Benzylrest von dem mit S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid acylierten Kollagenpräparat durch Reduktion mit metallischem Natrium in flüssigem Ammoniak nach der Methode von Du Vigneaud (67) abzuspalten, um auf diese Weise zur freien Sulfhydrylgruppe zu gelangen, zeigte es sich, dass das Kollagen diesen Bedingungen nicht standzuhalten vermag. Das Protein ging hierbei unter völliger Zerstörung der Faserstruktur in Lösung. Damit hatte sich der Weg über die Benzyl-Schutzgruppe als nicht gangbar erwiesen. Die Einführung des Thioglykolsäurerestes musste nun über das Dithiodiglykolsäure-Dichlorid bezw. -Anhydrid versucht werden.

b) Umsetzung von Sehnenkollagen mit Dithiodiglykolsäure-Dichlorid

Versuche an den Modells substanzten hatten ergeben, dass ein Zusatz von

Die analytischen Daten des bei den Umsetzungen verwendeten Sehnenkollagens sind in Tab. 2 zusammengefasst. Die Werte für die basischen Aminosäuren wurden einer quantitativen Aminosäure-Analyse (69) entnommen, während der Gehalt an Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt wurde.

Der ermittelte Gehalt an Gesamt-S von 0,32% stimmt gut mit den von Gustavson (70) und Zahn (71) angegebenen Werten überein. Wie aus der Tab. 2 hervorgeht, enthält 1 g Kollagen demnach 0,38 mMol acylierbare ϵ -Aminogruppen (einschliesslich der NH-Gruppe des Histidin-Imidazolrings).

Tab. 2

Analytische Daten des verwendeten Sehnenkollagens

Gehalt an:	Mol %	Gew. %	mMol/g Kollagen
N	-	17,0	-
Gesamt-Schwefel	-	0,32 ⁺⁾	0,09
anorg. Schwefel	-	0,04	0,01
Methionin-Schwefel	-	0,11	0,03
Methionin	0,36	0,46	0,035
Lysin	2,24	3,67	0,223
Hydroxylysin	0,93	1,33	0,092
Histidin	0,65	1,11	0,064

⁺⁾ Methionin ist die einzige im Sehnenkollagen vorkommende Aminosäure, die Schwefel enthält. Der ermittelte gesamte S-Gehalt des Kollagens von 0,32 % wird aber durch den Methionin-S-Gehalt von 0,11 % bei weitem

führte mit einer Ausbeute von 58,4 % zu dem kristallinen, analysenreinen Produkt α -N-Benzoyl- ϵ -N, (S-Benzyl)-Thioglykoyl-DL-Lysin. Auf eine Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe durch metallisches Natrium in flüssigem Ammoniak nach Du Vigneaud (67) wurde in diesem Falle - ebenso wie bei der analogen unter 2. a) α) beschriebenen Butylamin-Verbindung S-Benzyl-Thioglykolsäure-n-Butylamid - verzichtet, nachdem sich gezeigt hatte, dass diese Reaktion am Kollagen nicht durchführbar ist.

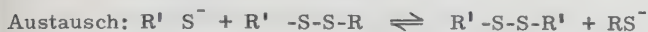
8) Versuche, das α -N-Benzoyl-DL-Lysin mit Dithiodiglykolsäure-Dichlorid und dem Anhydrid der Dithiodiglykolsäure umzusetzen, scheiterten an der Tatsache, dass auf Grund des zwitterionischen Charakters des Lysin-Derivats in wässriger Lösung gearbeitet werden muss. Hierbei ist die Anwendung dieser beiden äusserst hydrolyseempfindlichen Acylierungsmittel jedoch nicht möglich. Der Versuch, diese Schwierigkeit durch Anwendung des in organischen Lösungsmitteln löslichen α -N-Benzoyl-DL-Lysin-Methylesters zu umgehen, erwies sich gleichfalls als nicht durchführbar, da sowohl das Dichlorid der Dithiodiglykolsäure wie unter 2. a) β) beschrieben, als auch deren Anhydrid mit tertiären Aminen, auf deren Zusatz zur Bindung der entstehenden Salzsäure nicht verzichtet werden kann, reagieren. Diese bei den Vorversuchen aufgetretenen Schwierigkeiten machten für die Umsetzung der ϵ -Aminogruppen des Kollagens mit den genannten disulfidhaltigen Acylierungsmitteln eine besondere Arbeitsweise notwendig, die an der betreffenden Stelle unter 3. b) und c) beschrieben ist.

3. Reaktionen am Kollagen

Bei den Versuchen, den Thioglykolsäurerest durch die drei Acylierungsmittel S-Benzyl-Thioglykolsäure, Dithiodiglykolsäure-Dichlorid und Dithiodiglykolsäure-Anhydrid in das Kollagen einzuführen galt es, durch Analyse der erhaltenen Produkte festzustellen, ob die Substitution der ϵ -Aminogruppen tatsächlich gelungen war. Zu diesem Zweck wurde der Gehalt an neu eingeführtem Schwefel nach der Mikromethode von Johnson und Nishita (68) bestimmt.

Zunächst war jedoch die im Ausgangsmaterial bereits enthaltene Menge an Schwefel zu ermitteln. Gleiches gilt für den Gehalt an basischen Aminosäuren soweit sie der Acylierung zugänglich sind.

Der Mechanismus des über das Merkaptid-Ion RS^- führenden, alkalikatalysierten Disulfidaustausches wurde von R.E. Benesch u. R. Benesch (63), sowie von Parker u. Kharasch (64) eingehend studiert und beschrieben. Er verläuft über folgende zwei Stufen:



b) α -N-Benzoyl-DL-Lysin als Modells substanz

α) Darstellung:

Um α -substituierte Derivate von DL-Lysin als Modells substanz einsetzen zu können, musste zunächst die α -Aminogruppe durch einen schwer abspaltbaren Rest blockiert werden.

Durch Umsetzung des DL-Lysin-Kupferkomplexes mit Carbobenzoylchlorid nach der Vorschrift von Neuberger u. Sanger (65) wurde in einem ersten Schritt die ϵ -Aminogruppe durch die leicht wieder abspaltbare Carbobenzoxygruppe maskiert.

In einem zweiten Schritt wurde die α -Aminogruppe des analysenrein erhaltenen ϵ -N-Carbobenzoxy-DL-Lysins durch Umsetzung mit Benzoylchlorid acyliert und damit als Aminfunktion ausgeschaltet. Da sich in der Literatur keine Vorschrift zur Benzoylierung dieses Produktes fand, musste die Umsetzung selbst ausgearbeitet werden. Das erhaltene Produkt war analysenrein.

Von dem auf diese Weise in 76,6%-iger Ausbeute dargestellten ϵ -N-Carbobenzoxy, α -N-Benzoyl-DL-Lysin wurde in einem dritten Schritt die Carbobenzoxy-Schutzgruppe durch katalytische Hydrierung nach Bergmann (66) wieder abgespalten.

Das auf diesem Wege mit 94,8%-iger Ausbeute erhaltene chromatographisch und analytisch reine α -N-Benzoyl-DL-Lysin mit der freien ϵ -Aminogruppe konnte nun als Modells substanz Verwendung finden.

β) Umsetzung von α -N-Benzoyl-DL-Lysin mit S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid zu α -N-Benzoyl- ϵ -N, (S-Benzyl)-Thioglykoyl-DL-Lysin

Die Umsetzung in Dioxan-Wasser unter Zusatz von verd. Natronlauge

bei der reduktiven Spaltung von Disulfidbrücken. Eine Übertragung der Reaktion auf entsprechend acylierte Kollagenpräparate sollte demnach durchaus möglich sein.

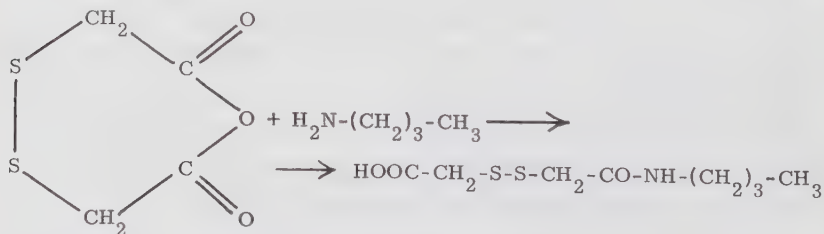
γ) Umsetzung von cyclischem Dithiodiglykolsäure-Anhydrid mit n-Butylamin

Der Versuch einer Darstellung von Dithiodiglykolsäure-mono-n-Butylamid durch Umsetzung von Dithiodiglykolsäure-Anhydrid mit n-Butylamin in abs. Aceton führte nicht zu dem erwarteten asymmetrischen Mono-substitutionsprodukt, sondern zu der symmetrischen Verbindung Dithiodiglykolsäure-di-n-Butylamid und Dithiodiglykolsäure. Das mit einer Ausbeute von 34,5 % isolierte Di-n-Butylamid wurde durch Mischschmelzpunkt mit dem unter β) hergestellten Produkt, Analyse und Molekulargewichtsbestimmung nach Rast identifiziert. Die gleichzeitig entstandene Dithiodiglykolsäure wurde ebenfalls isoliert, doch muss angenommen werden, dass diese zum Teil durch Hydrolyse des Anhydrids gebildet wurde.

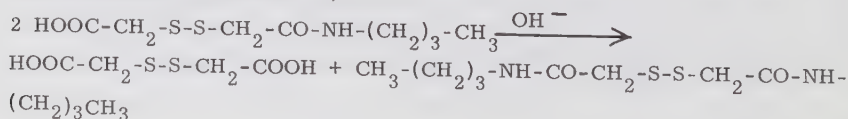
Die Entstehung des symmetrischen Endproduktes wird durch einen in ähnlichen Fällen häufig zu beobachtenden alkalikatalysierten Disulfidaustausch gut erklärt.

Der Reaktionsverlauf stellt sich demnach wie folgt dar:

Primärreaktion:



Sekundärreaktion (Austausch):



setzt, um die gleichzeitig entstehende Salzsäure zu binden. Durch Umkristallisieren aus Essigester-Petroläther wurde ein kristallines, analysenreines Produkt erhalten.

Die nur etwa 50%-ige Ausbeute ist wohl darauf zurückzuführen, dass ein Teil des hydrolyseempfindlichen Säurechlorids monofunktionell statt bifunktionell wie erwartet, mit dem Amin reagiert hat. Das Studium der Reaktion ergab, dass eine Umsetzung unter Zusatz eines tertiärenamins (Pyridin, Chinolin, Triäthylamin) zur Bindung der entstehenden HCl nicht durchführbar ist, da - wie zahlreiche Versuche zeigten - das Dithiodiglykolsäure-Dichlorid in Gegenwart tertiärer Amine verharzt. Aus den teerigen Produkten liess sich keine definierte Verbindung isolieren. Das in wässrigem Äthanol gelöste Dithiodiglykolsäure-di-n-Butylamid wurde nach Goddard und Michaelis (62) mit Na-Thioglykolat bei pH 9,0 reduziert. Das nach Ansäuern und Extrahieren mit Essigester in Form eines Öles mit einer Ausbeute von 98,8 % anfallende, an der Luft rasch oxydierende Thioglykolsäure-n-Butylamid wurde mit Hopkins-Reagenzlösung als Hg-Salz ausgefällt. Das Salz liess sich nur aus heisser halbkonz. HCl umkristallisieren. Hierbei war aus dem zunächst in der Form:



vorliegenden Hg-Salz unter Einwirkung der Salzsäure eine Verbindung entstanden, welcher folgende Formel zukommt:



Dabei wurden 50 % des organischen Thioglykolsäure-n-Butylamid-Restes als freie Sulfhydrylverbindung abgespalten und durch Chlorid ersetzt. Die Formel (2) wurde durch Analyse bestätigt. Das Produkt ist jedoch möglicherweise dimer. Eine Molekulargewichtsbestimmung nach Rast war nicht möglich, da die Substanz in Campher unlöslich ist. Aus dem Hg-Salz wurde durch Behandeln mit H_2S das Thioglykolsäure-n-Butylamid in Form eines Öles wieder in Freiheit gesetzt. Nach erfolgter Luftoxydation bestätigte der Mischschmelzpunkt, dass das Produkt mit der Ausgangssubstanz Dithiodiglykolsäure-di-n-Butylamid identisch war. Die auf diese Weise erfolgte Rückführung des Produktes in die Ausgangsverbindung bewies die gute Verwendungsmöglichkeit von Na-Thioglykolat

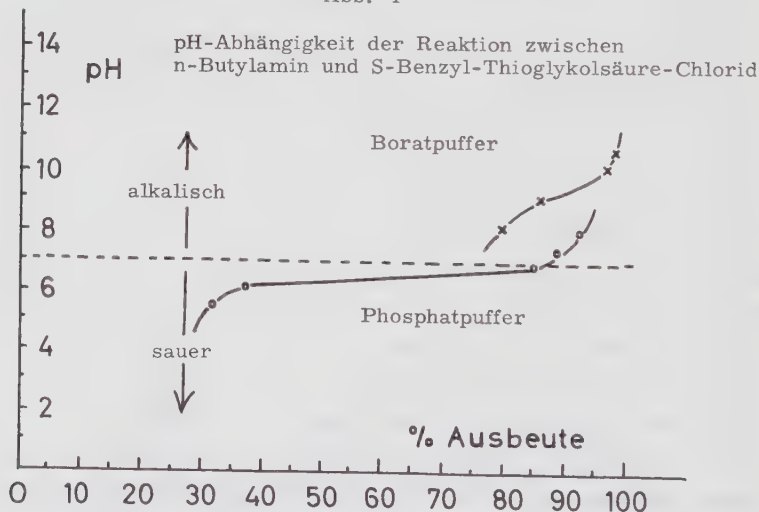
+) Unter pH-Abfall wird das Absinken des pH-Wertes nach erfolgter Zugabe des Säurechlorids verstanden. Diese Werte, ebenso wie die pH-Differenzen nach erfolgtem Aminzusatz, sind ein direktes Mass für die Pufferkapazität, die nach den Randgebieten hin nachlässt.

Die Ergebnisse zeigen, dass selbst eine bei pH 7,0 durchgeführte Reaktion auf Grund der sehr raschen Einstellung des Gleichgewichtes:



Unterhalb pH 7,0 fallen die Ausbeuten dagegen rasch ab. Eine Umsetzung von Kollagen mit S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid im schwach alkalischen Bereich erscheint demnach durchaus möglich.

Abb. 1



β) Umsetzung von n-Butylamin mit Dithiodiglykolsäure-Dichlorid und Reduktion der Disulfidbrücke

Die Umsetzung von n-Butylamin mit Dithiodiglykolsäure-Dichlorid in abs. Äther führte bei einer Ausbeute von 48,3 % zum Dithiodiglykolsäure-di-n-Butylamid. Bei der Umsetzung wurde ein Überschuss an Butylamin einge-

S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorids mit Kollagen zu studieren, wurde die pH-Abhängigkeit der Reaktion zwischen n-Butylamin und S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid genau untersucht.

Die Umsetzung mit Kollagen sollte nämlich bei möglichst niedrigem pH-Wert erfolgen, um eine Quellung zu vermeiden, die möglicherweise nicht mehr rückgängig gemacht werden kann und die bei der anschliessenden elektronenmikroskopischen Untersuchung Anlass zu unscharfen Abbildungen gibt. Bei den Untersuchungen wurde unter Verwendung von Phosphat- und Boratpuffern an Stelle von Pyridin, die Ausbeute an Säureamid innerhalb des pH-Bereiches von 5,4 - 10,6 gravimetrisch bestimmt.

Die in Tab. 1 zusammengefassten Ergebnisse dieser pH-Abhängigkeitsversuche wurden in Abb. 1 in Form eines Diagrammes graphisch aufgetragen. Man erhält zwei Kurven, die in ihrem Verlauf an Titrationskurven erinnern.

Tab. 1

pH-Abhängigkeit der Reaktion zwischen S-Benzyl-Thioglykolsäure-Chlorid und n-Butylamin:

Puffer:	pH	Ausbeute	pH-Abfall ⁺)	pH-Anstieg (bei Amin- zusatz)
Phosphat- puffer (1 molar)	5,40	31,8 %	2,39	0,78
	6,00	37,1 %	2,69	0,32
	7,00	86,0 %	1,38	0,18
	7,40	89,4 %	1,27	0,60
	8,00	92,8 %	3,73	2,23
Borat- puffer (1 molar)	8,11	79,5 %	4,45	0,89
	9,00	86,0 %	2,00	0,38
	10,00	97,5 %	1,15	0,16
	10,63	98,45 %	0,93	0,14

beim Erhitzen mit Campher zersetzt. Das Anhydrid hydrolysiert rasch beim Stehen an der Luft. Die entstehende Dithiodiglykolsäure wurde durch Mischschmelzpunkt charakterisiert. Im Gegensatz zur Säure ist das Anhydrid in Äther unlöslich, ebenso in Benzol und Alkohol, dagegen wird es von warmem Aceton rasch gelöst.

2. Reaktionen an den Modellsubstanzen

Die Substitution von Aminogruppen durch die beschriebenen Acylierungsmittel wurde zunächst an Modellsubstanzen studiert. Diese Arbeitsweise hatte sich vor allem bei den Versuchen mit den beiden disulfidhaltigen Reagenzien als notwendig erwiesen, nachdem dieselben sehr leicht Verharzungsreaktionen unterliegen. Durch die Reaktionen an Modellsubstanzen galt es, die mildesten Bedingungen für eine möglichst quantitative Umsetzung von Aminogruppen mit den genannten Reagenzien zu ermitteln. Erst nach erfolgreichem Abschluss der Modellversuche sollten die Reaktionen am Kollagen selbst ausgeführt werden.

Als Modellsubstanzen wurden n-Butylamin und α -N-Benzoyl-DL-Lysin gewählt, die beide den Vorzug haben, im pK-Wert - dieser für alle an der NH_2 -Gruppe angreifenden Reaktionen wichtigen Grösse - mit dem für die ϵ -Aminogruppe des Kollagens ermittelten Wert übereinzustimmen. (Gustavson) (61):

n-Butylamin,	pK: 10,6
Lysin (ϵ -Amino),	pK: 10,5
Kollagen (ϵ -Amino),	pK: 11,0

a) n-Butylamin als Modellsubstanz

α) Umsetzung von n-Butylamin mit S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid zu S-Benzyl-Thioglykolsäure-n-Butylamid

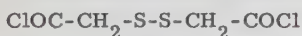
Bei der Darstellung dieses bisher nicht beschriebenen Säureamids führt die Reaktion unter Anwendung der doppelten stöchiometrischen Menge an Säurechlorid unter Einsatz von Pyridin als HCl-bindender Base zu einer Ausbeute von 93,8 %. Das gebildete Säureamid, ein gelbliches Öl, konnte nach Vakuumdestillation analysenrein erhalten werden.

Um die günstigsten Bedingungen für eine quantitative Umsetzung des

(59) durch Reaktion mit Thionylchlorid. Nach Abdestillieren des überschüssigen Thionylchlorids wurde das entstandene S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid fraktioniert. Die Ausbeute betrug 84,0 % der Theorie.

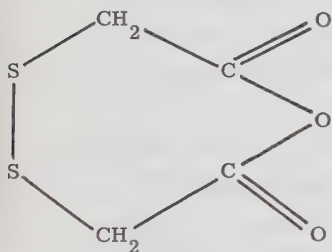
Im Interesse einer besseren Ausbeute wurden die Darstellungsmethoden geringfügig modifiziert (s. experimenteller Teil zu Kapitel I).

b) Dithiodiglykolsäure-Dichlorid:



Die Darstellung des Dichlorids der Dithiodiglykolsäure geschah nach der Vorschrift von Gulland, Partridge und Randall (60) durch Umsetzung von Dithiodiglykolsäure mit Phosphorpentachlorid in abs. Äther bei -10°C . Die Ausbeute betrug 64,0%.

c) Cyclisches Dithiodiglykolsäure-Anhydrid:



Die Darstellung des bisher in der Literatur nicht beschriebenen Anhydrids der Dithiodiglykolsäure gelang durch Umsetzung der Säure mit Acetylchlorid am Rückfluss. Die entstehende Salzsäure entweicht zum Teil aus dem Reaktionsgemisch, die gleichzeitig gebildete Essigsäure muss gemeinsam mit dem überschüssigen Acetylchlorid anschließend

am Vakuum abdestilliert werden. Das zurückbleibende Dithiodiglykolsäure-Anhydrid wird aus abs. Essigester-Äther umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 68,1 % der Theorie. Ein Versuch, das Anhydrid nach der üblichen Methode durch Umsetzung der Säure mit Essigsäureanhydrid darzustellen misslang, da auf Grund des wesentlich höheren Siedepunktes des Essigsäure-Anhydrids ($139,4^\circ \text{C}$) beim Abdestillieren der letzten Reste unter vermindertem Druck völlige Zersetzung des sehr temperaturempfindlichen Produktes eintrat.

Die Konstitution der Verbindung, ein 7-Ring mit Disulfid-Brücke konnte durch die Ergebnisse der Elementaranalyse bestätigt werden. Eine Molekulargewichtsbestimmung nach Rast war nicht durchführbar, da sich das Anhydrid

B. Ergebnisse

I. Versuche zur elektronenmikroskopischen Lokalisierung der ϵ -Aminogruppen im Kollagen

Für eine elektronenmikroskopische oder röntgenographische Lokalisierung der ϵ -Aminogruppen des Kollagens erschien es notwendig, dieselben mit Substituenten zu besetzen, die durch Schwermetalle hohen Molekulargewichtes (Ag, Pb) beladen werden können. Als geeigneter Weg zur Verwirklichung dieses Zieles erschien die Acylierung der Aminogruppen mit SH-haltigen Substituenten und die anschliessende Umsetzung der Sulfhydrylgruppen mit Schwermetallsalzen.

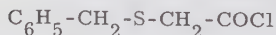
1. Acylierungsmittel

Bei den verwendeten Acylierungsmitteln handelt es sich durchweg um Derivate der Thioglykolsäure. Die Einführung des Thioglykolsäurerestes wurde über drei verschiedene Wege versucht:

1. Über ein SH-geschütztes Derivat, nämlich S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid. Die S-Benzylgruppe kann durch Natrium in flüssigem Ammoniak abgespalten werden.
2. Über das bifunktionelle Säurechlorid der Dithiodiglykolsäure und anschliessende Reduktion der Disulfidbindung.
3. Über das cyclische Anhydrid der Dithiodiglykolsäure und anschliessende Reduktion.

Die genannten Acylierungsmittel waren auf folgenden Wegen zugänglich:

a) S-Benzyl-Thioglykolsäurechlorid:



S-Benzyl-Thioglykolsäure wurde nach Andreasch (58), durch Benzylierung von Na-Thioglykolat in wässriger Natronlauge dargestellt. Die Ausbeute betrug 98,7%.

Die Umsetzung zum Säurechlorid erfolgte nach Lesser und Mehrländer

Empfindlichkeit zu verfeinern. Das umfasste sowohl eine Untersuchung der Hydrolysebedingungen als auch eine methodische Weiterentwicklung der chromatographischen Auftrennung der erhaltenen DNP-Aminosäuren.

4.) Die verfeinerte Methode der Amino-Endgruppenbestimmung sollte dazu herangezogen werden, die Spaltung von Peptidketten bei der Einwirkung verschiedener Reagenzien zu kontrollieren, die eine Spaltung der Quervernetzungen des Kollagens zur Folge haben.

Dabei handelt es sich

- a) um die Einwirkung von Pepsin auf natives Kollagen, die mit einer Spaltung von Quervernetzungen und nach Vorstellung von F.O.Schmitt auch mit einer Abspaltung endständiger Peptidsequenzen verbunden ist;
- b) um die Einwirkung von Perjodat, welches die Kohlenhydratvernetzungen und einige wenige empfindliche Aminosäuren des Kollagens in den Seitenketten zerstört, sowie
- c) um die Einwirkung von Hydroxylamin, das esterartige Bindungen in den Quervernetzungen des Kollagens angreift. Die Reaktion mit Hydroxylamin sollte auf Grund der Ergebnisse der Endgruppenbestimmung und mit der weiteren Hilfe der hierbei angewandten Methode verbessert und durch Einsatz von Ultrazentrifuge und Elektronenmikroskop ausgebaut werden. Ausserdem war im Anschluss an Ergebnisse von Gallop et al. (57) zu prüfen, ob die seitenständigen Carboxylgruppen der Asparagin- und Glutaminsäure an Reaktionen mit Hydroxylamin beteiligt sind. Durch Lossen'schen Abbau sollte versucht werden, die seitenständigen Hydroxamsäurereste in Aminogruppen überzuführen.

III. Aufgabenstellung

Das Grundgerüst der vorliegenden Arbeit bilden Untersuchungen über verschiedene Substitutionsreaktionen an den Aminogruppen des Kollagens und zwar sowohl an den Aminofunktionen in den Seitenketten der Lysinreste als auch an den α -Aminoenden. Durch Einführung geeigneter Substituenten in die ϵ -Aminogruppen sollten Derivate des Kollagens geschaffen werden, die für elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Lokalisierung der Lysinreste im Tropokollagen brauchbar erscheinen. Quantitative Versuche sollten weiterhin die Zugänglichkeit der ϵ -und

α -Aminogruppen für Substitutionsreaktionen klären. Es war festzustellen, ob und wieviele dieser Gruppen im Kollagen frei und wieviele geschützt vorliegen. Die vor allem bei der Untersuchung der Aminoenden erarbeiteten quantitativen Bestimmungsmethoden sollten darüberhinaus dazu eingesetzt werden festzustellen, wie weit verschiedene spezifische Abbaureaktionen des Kollagens mit Schädigungen der Peptidkette verbunden sind. In einem Falle (Punkt 4c) sollten die dabei gewonnenen Ergebnisse auch zu einer Weiterentwicklung und Verbesserung der Abbaumethoden führen. Im einzelnen waren folgende Probleme zu bearbeiten:

1.) Die ϵ -Aminogruppen des Kollagens sollten mit sulfhydrylhaltigen Substituenten besetzt werden. Die auf diese Weise eingeführten SH-Funktionen sollten mit Schwermetallen beladen, eine Lokalisierung der ϵ -Aminogruppen im Elektronenmikroskop ermöglichen. Acylierungsmethoden und Reaktionsbedingungen waren zuvor eingehend an Modellsubstanzen zu studieren.

2.) Die Beteiligung von ϵ -Aminogruppen an der Quervernetzung war durch Überprüfung der Substituierbarkeit freier ϵ -Aminogruppen der basischen Seitenketten des Kollagens zu untersuchen.

3.) Die Aminogruppen von nativem und denaturiertem Tropokollagen und Kollagen sollten nach der DNP-Methode quantitativ und qualitativ bestimmt werden. Da Endgruppen wegen des grossen Molekulargewichtes der Peptidketten des Kollagens (100 - 120.000) nur in sehr geringer Menge zu erwarten waren, war die Methode auf eine entsprechende

an Ovalbumin (52) und Myosin (53) führten zu negativen Ergebnissen. Die Deutung dieser Befunde erscheint schwierig. Seitdem jedoch bekannt wurde, dass die Aminoendgruppe des Cytochroms C aus Pferdeherz (54), der Proteinkomponente des Tabakmosaikvirus (55) und wahrscheinlich auch die des Ovalbumins (52) und anderer Proteine acetyliert ist, muss diese, sowie eine Reihe anderer Möglichkeiten (wie endständige Pyrrolidoncarbonsäure, nachgewiesen an Fibrinogen B (104) N-Phosphorylierung und Blockierung durch Mucopolysaccharide) auch für das Kollagen diskutiert werden. Im Jahre 1958 erschien eine Arbeit von Deasy (56), in welcher über den Nachweis äquivalenter Mengen an Asp, Gly und Ser als echte α -Aminoendgruppen des Kollagens berichtet wird. Genaue Angaben über die Mengen der als DNP-Derivate isolierten Aminosäuren fehlen.

Grundsätzliche Erwägungen und diese sich zum Teil widersprechenden oder unklaren Befunde, gaben den Anlass, die Frage der Aminoendgruppen des Kollagens im Verlaufe dieser Arbeit erneut zu überprüfen.

Endgruppen im Kollagen

Seit Einführung der eleganten Dinitrofluorbenzol-Methode zum Nachweis von Aminoendgruppen durch Sanger (46), konnte in einer ganzen Reihe kompliziert gebauter, hochmolekularer Proteine, wie Hämoglobin, Myoglobin, Edestin, Serumalbumin und vielen anderen, die N-terminalen Aminosäuren exakt bestimmt werden (47).

Ausgehend von der beschriebenen Struktur des Tropokollagenmoleküls, welches ein Molekulargewicht von 360 000 besitzt und aus drei vernetzten Polypeptidspiralen aufgebaut ist, kommt man zu dem Ergebnis, dass jedes der drei Kettenenden jeweils eine Aminoendgruppe tragen sollte, oder dass- anders ausgedrückt - auf etwa 1.000 Mol Aminosäuren 1 Mol Endgruppen entfallen sollten.

Bei Anwendung der Sangerschen Methode auf das Kollagen durch Graßmann und Hörmann (48), Bowes und Moss (38), sowie Joseph und Bose (49), konnten die Autoren jedoch keine Aminoendgruppen nachweisen. Nur sehr kleine Mengen der verschiedensten Aminosäuren, vor allem Asp, Gly, Glu, Ser, Ala, wurden in Form ihrer DNP-Derivate identifiziert. Von den meisten dieser Aminosäuren ist bekannt, dass Peptidbindungen, an denen sie mit ihrer Aminogruppe beteiligt sind, leichter hydrolytisch gespalten werden als andere (50). Es ist daher verständlich, dass bei Endgruppenbestimmungen an Gelatine, d.h. an alkali-behandeltem, verkochtem Kollagen, vor allem diese an labilen Bindungen beteiligten Aminosäuren in mehr oder weniger grossen Mengen auftreten (36, 51), wobei gleichzeitig als Folge der Spaltung von Peptidbindungen, eine starke Abnahme des Molekulargewichtes zu beobachten ist.

Soweit bisher am Kollagen Bestimmungen der Aminosäuren der Carboxylenden durchgeführt wurden, stimmen sie mit den Untersuchungen über die Aminoendgruppen überein. Auch hier konnten nur Spuren von Aminosäuren nachgewiesen werden (48). Allerdings gibt es für den Nachweis carboxylendständiger Aminosäuren noch keine, der Sanger'schen an Einfachheit und Sicherheit vergleichbare Methode.

Kollagen ist aber nicht das einzige Beispiel eines hochmolekularen Eiweisskörpers ohne nachweisbare Aminoendgruppen. Auch Untersuchungen

an Lösungen, die durch Einwirkung höherer Enzymkonzentrationen (Kollagen: Pepsin = 40: 1) auf säureunlösliches Kälberkollagen hergestellt worden waren, ergaben eine merkliche Abnahme der Viskositätszahl, die einer vollständigen Aufspaltung des zu Aggregaten von Polymeren zusammengesetzten Kollagens in einzelne monomere Tropokollagenmoleküle entsprechen könnte. Diese Ergebnisse wurden durch Arbeiten von F. O. Schmitt et al. (44) bestätigt.

Dass aber auch das Kollagenmonomere selbst durch die Einwirkung von Pepsin in charakteristischer Weise verändert wird, ergab sich aus Untersuchungen von F. O. Schmitt, Kühn und Nishihara. So konnte Kühn (45) die bereits von F. O. Schmitt (44) gemachte Beobachtung bestätigen, dass ein gleichzeitiger Angriff des Pepsins auf die intramolekularen Bindungen des Kollagens erfolgt. Sedimentationsversuche ergaben, dass eine 40-stündige Einwirkung sehr hoher Pepsinkonzentrationen (Kollagen: Pepsin = 2 : 1) auf Sehnenkollagen bei pH 2,0 u. 25° C, die β -Komponente völlig zum Verschwinden bringt, so dass nur noch reines, unvernetztes α -Tropokollagen vorliegt. Dies bedeutet, dass durch das Enzym nicht allein die intermolekularen Bindungen zwischen den einzelnen Tropokollagenmonomeren gespalten werden, was zu einer völligen Auflösung des Materials führt, sondern dass darüberhinaus auch die intramolekularen Bindungen, welche die drei Peptidketten innerhalb der Tropokollagenmolekel miteinander vernetzen, durch Pepsin geöffnet werden.

Neben dieser Spaltung intramolekularer Quervernetzungen konnten F. O. Schmitt (44) und Nishihara (41) als weiteren Effekt eine durch das Enzym bewirkte Abspaltung endständiger Peptidsequenzen, sogenannter Telopeptide, vom Rumpf des Kollagenmonomeren beobachten. Die Aminosäure-Zusammensetzung dieser Peptide unterscheidet sich grundlegend von der des eigentlichen Tropokollagenmoleküls. Auffallend ist vor allem der hohe Gehalt an Tyrosin und ein nahezu völliges Fehlen des für das Kollagen so charakteristischen Hydroxyprolins.

weiterer Arten von Quervernetzungen diskutiert, die möglicherweise im Kollagen verwirklicht sein könnten. Von Gustavson (21) wurde zuerst auf die Möglichkeit hingewiesen, dass seitenständige Carboxylgruppen einer Peptidkette mit den Hydroxylgruppen des Hydroxyprolins, Serins oder Threonins einer zweiten Kette verestert sind. Dies würde erklären, weshalb ein Teil dieser Hydroxylgruppen einer Acetylierung nicht zugänglich ist (37). Untersuchungen an Gelatine führten Gustavson (21a) zu der Annahme, dass die Guanidogruppen des Arginins, die ebenfalls zum Teil in maskierter Form vorliegen, über seitenständige Carboxylgruppen der Nachbarkette covalent gebunden seien.

Hierbei handelt es sich um Hypothesen, die noch des exakten experimentellen Nachweises bedürfen.

Eine weitere Möglichkeit zur Ausbildung von Quervernetzungen zwischen den Tropokollagenmolekülen besteht in der amidartigen Verknüpfung der seitenständigen Carboxylgruppen mit ϵ -Aminogruppen von Lysinresten. Verschiedene Befunde (38, 39, 40), nach denen die ϵ -Aminogruppen des Kollagens nur unvollkommen substituiert werden können (vergl. dazu S. 33f), scheinen diese Vorstellungen zu stützen.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, zur Klärung dieser Fragen beizutragen.

Kollagen und Proteasen

Enzymatische Untersuchungen ergaben, dass Kollagen in nativer Form nur durch das Enzym Kollagenase abgebaut wird. Von Proteasen wie Pepsin und Trypsin wird Kollagen nur im denaturierten Zustand verdaut. Gewisse Veränderungen vermag Pepsin jedoch auch am nativen Kollagen hervorzurufen.

Nach Arbeiten von Nishihara (41), sowie von Kühn und Hörmann (42) kann reifes Kollagen durch Einwirkung von Pepsin bei 25° C in stark verdünnter Säure vollständig in Form nativer Teilchen in Lösung gebracht werden. Aus diesen Lösungen lassen sich wieder Fibrillen des nativen Typs mit elektronenmikroskopischer Querstreifung und long-spacing Segmente (SLS) ausfällen.

Von Hörmann und Hafter (43) durchgeführte Viskositätsmessungen

der Kollagenfaser beteiligt sein müssen.

Durch Untersuchungen von Hörmann und Fries (35) sowie von Klenk (19b) wurden diese Befunde weiter ausgebaut. Es hatte sich gezeigt, dass durch Einwirkung von Perjodat auf reifes Kollagen in essigsauerm Medium bei Zimmertemp. die Hexosen bis auf einen kleinen Rest zerstört werden. Darüberhinaus werden die Seitenketten des Hydroxylysins, Tyrosins und Methionins in einer langsamen Reaktion oxydiert, was zu charakteristischen Veränderungen der Aminosäurezusammensetzung führt. Klenk war es schliesslich gelungen, durch gleichzeitige Einwirkung von Perjodat und von Wasserstoffbrücken sprengenden Agenzien (z.B. Harnstoff) auf Kollagen, dieses hochmolekular in Lösung zu bringen.

Vergleicht man die Menge an Hexosen mit dem Anteil an hydroxylaminempfindlichen Bindungen der für die intermolekularen Quervernetzungen verantwortlich ist, so stellt man fest, dass beide annähernd übereinstimmen (19b, 36).

Aus all diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass diese Quervernetzungen durch den Einbau von Kohlenhydraten in das Kollagen zustande kommen und zwar derart, dass die reduzierende Gruppe des Kohlenhydrats O-glycosidisch an die Dreierspirale eines Tropokollagenmoleküls gebunden ist, während eine oder gar mehrere der Hydroxylgruppen des Zuckers mit Carboxylgruppen einer zweiten Dreierspirale verestert sind. Auf diese Weise kommt es zur Ausbildung von bifunktionellen, möglicherweise trifunktionellen quervernetzenden Verknüpfungen (19a) der die Faser aufbauenden Tropokollageneinheiten. Diese Vorstellungen bedürfen jedoch noch einer weiteren Bestätigung. So ist vor allem noch ungewiss, welche der freien Hydroxyl- und Carboxylgruppen des Kollagens am Einbau der Hexosen beteiligt sind. Da auf 1.000 Mol Aminosäuren etwa 4 Mol Hexosen bzw. Quervernetzungen entfallen, sollten von jeder Dreierspirale, jeweils im Abstand einer Identitätsperiode von $640 \text{ \AA}$, zwei Vernetzungsvalenzen ausgehen.

Weitere Quervernetzungen über funktionelle Gruppen

Von verschiedenen Arbeitskreisen werden seit längerer Zeit eine Reihe

in 0,75 m NH_2OH bei pH 8,5 langsam auf, wobei sich Hydroxamsäuren bilden. Durch Dialyse gegen Wasser kann es wieder in Form von Fasern mit der charakteristischen Querstreifung des nativen Kollagens abgetrennt werden. In reifem, nativem Kollagen sind die Hydroxylaminempfindlichen Bindungen dagegen bei mässig alkalischer Reaktion (pH 9,5) nicht zugänglich. Sie reagieren nur dann unter Auflösung des Kollagens mit NH_2OH , wenn das Eiweiss zuvor durch Temperatureinwirkung oder durch gleichzeitigen Zusatz von LiCl denaturiert wurde.

Die Beteiligung von Hexosen an Quervernetzungen

Im Jahre 1935 wurde von Graßmann und Schleich (27) erstmals eine Kohlenhydratkomponente des Kollagens entdeckt. Später fand man (28, 10c), dass selbst Tropokollagen, welches durch wiederholtes Umkristallisieren hochgereinigt worden war, einen Gehalt von etwa 0,5 Gew.% Hexosen aufweist. Die gleiche Menge wurde im reifen Kollagen gefunden. Dieser Anteil ist fest mit dem Faserprotein verbunden und kann nicht wie die zu 0,2 - 0,5 % in Kollagen enthaltenen Hexosamine (29) ohne tiefgreifende chemische Veränderungen von ihm abgetrennt werden. Bei diesen Zuckern handelt es sich vor allem um Glucose und Galactose (19b, 27, 28) neben sehr kleinen Mengen Mannose (30) und Fucose (31).

Was nun die Art der Bindungen dieser Hexosen an das Kollagen betrifft, so konnte nachgewiesen werden, dass die Zucker ihre reduzierenden Eigenschaften verloren haben und nicht N-glycosidisch gebunden sein können, da sie sonst mit Phenylhydrazin Osazone bilden sollten, was jedoch nicht der Fall ist (32). Näheren Aufschluss über die Bedeutung der Hexosen in Kollagen ergab ihr Abbau durch Perjodat. Die Einwirkung von Perjodat auf Kollagen wurde erstmals von Bangle und Alford (33) sowie von Graßmann und Kühn (34) genauer untersucht. Hierbei ergab sich, dass Kollagen durch Na-Perjodat bei mässig erhöhter Temperatur (40°C , pH 8,0) innerhalb von wenigen Tagen gelöst wird. Da bekannt war, dass Perjodat eine oxydative, spezifische Spaltung von 1,2-Glykolgruppierungen bewirkt, ein Strukturelement, welches für Kohlenhydrate charakteristisch ist, schlossen die Autoren daraus, dass diese massgeblich am Aufbau

werden muss: Einerseits können sich innerhalb des Tropokollagenmoleküls zwischen den einzelnen Peptidketten der Dreierspiralen Querverbindungen ausbilden. Hierbei handelt es sich um eine intramolekulare Vernetzung. Andererseits ist auch eine intermolekulare Verbindung (19) zwischen verschiedenen Tropokollageneinheiten denkbar. Die erwähnten Löslichkeitsunterschiede zwischen Tropokollagen und Kollagen können nur durch das Vorhandensein von intermolekularen Quervernetzungen gedeutet werden. Dass auch intramolekulare Vernetzungen in löslichem Kollagen vorhanden sein müssen, folgt aus Arbeiten von Veis (22), von Doty und Nishihara (23) sowie Graßmann, Hannig und Engel (24). Die Autoren beobachteten, dass citratgelöstes Tropokollagen beim Denaturieren in zwei Fraktionen α und β zerfällt. Molekulargewichtsbestimmungen an der Ultrazentrifuge ergaben Werte von 115.000 für α und 215.000 für β . Die Deutung lag nahe, dass es sich bei der schwereren Fraktion (β) um zwei noch miteinander verknüpfte Peptidketten, bei der leichteren um eine Einzelkette handeln müsse. Schliesslich wurde eine dritte sogenannte γ -Komponente vom Molekulargewicht 300.000 ermittelt, die offensichtlich aus drei noch intramolekular miteinander vernetzten Polypeptidketten bestand.

Von Gallop (25) sowie von Hörmann und Klenk (19, 26) wurden die Quervernetzungen erstmals einer genaueren chemischen Analyse unterworfen. Hierbei konnte die Vermutung, dass es sich um Esterbrücken handeln könne, durch die Tatsache gestützt werden, dass sich gewisse Bindungen bei denaturiertem Kollagen und Tropokollagen durch Umsetzung mit Hydroxylamin in Hydroxamsäuren überführen lassen. Genaue Hydroxamsäurebestimmungen ergaben, dass Kollagen mehr hydroxylaminempfindliche Bindungen enthält als Tropokollagen, wobei sich nach Hörmann und Klenk die Differenz von 0,4 Mol/100 Mol Aminosäuren auf die intermolekularen Quervernetzungen des Kollagens zurückführen lässt.

Die hydroxylaminempfindlichen Bindungen des reifen Kollagens und des Tropokollagens, die in ihrem Verhalten Esterbindungen entsprechen, unterscheiden sich aber nicht nur in ihrer Anzahl, sondern auch in ihrer Reaktionsfähigkeit. So löst sich natives Tropokollagen

II. Quervernetzung und funktionelle Gruppen des Kollagens

Die Frage, welche chemischen Veränderungen den Übergang von löslichem Tropokollagen zum unlöslichen, reifen Kollagen begleiten, ist seit langem zu einem der wichtigsten Probleme der Kollagenforschung geworden.

Physikalisch-chemische Untersuchungen des gummielastischen Verhaltens von denaturiertem Kollagen (18), zeigten, dass es sich bei reifem Kollagen um ein linearpolymeres Gebilde handeln muss, dessen Tropokollagenbausteine in weiten Abständen durch Quervernetzungen verbunden sind. Die grosse Resistenz dieser Vernetzungen gegen Wasserstoffbrücken sprengende Agentien (19), wie konz. Lösungen von Harnstoff, LiCl und NaClO_4 sowie gegen Hitze, lässt darauf schliessen, dass es sich hierbei um Hauptvalenzkräfte handelt.

Während Tropokollagenfibrillen beim Erwärmen auf 61°C in gelatinöser Form in Lösung gehen, schrumpft reifes Kollagen etwa bei der gleichen Temperatur lediglich zu einer Masse von kautschukartiger Konsistenz zusammen ohne sich aufzulösen. Wasserstoffbrückensprenger lösen Tropokollagen unter Denaturierung auf; Kollagen wird dagegen nicht aufgelöst (19, 20).

Diese Tatsachen lassen sich nur dann verstehen wenn man annimmt, dass im Kollagen Quervernetzungen vorhanden sind, die im Tropokollagen fehlen.

Hydroxylaminempfindliche Bindungen (Esterbrücken)

Von Gustavson (21) wurde erstmals die Vermutung geäussert, dass es sich bei diesen hauptvalenzmässigen Vernetzungen um Esterbrücken handeln könnte, die durch Reaktion der Carboxylgruppen von Dicarbonsäuren mit den Hydroxylgruppen einer benachbarten Peptidkette zustandekommen.

Die Diskussion dieser Fragen ergab jedoch sehr bald, dass grundsätzlich zwischen zwei verschiedenen Arten von Quervernetzungen unterschieden

vorstufen als Tropokollagen zu bezeichnen. Aus den erwähnten Extrakten scheiden sich - z.B. nach Dialyse gegen Wasser - Fibrillen ab (12, 13b), die eine normale Querstreifung zeigen, in den meisten chemischen und physikalischen Eigenschaften mit den Fibrillen des reifen Kollagens übereinstimmen, im Gegensatz zu diesen aber in verdünnter Essigsäure und in Citratpuffer vom pH 3,8 löslich sind. Auch durch Wasserstoffbrücken sprengende Reagenzien, wie Lithiumchlorid und Harnstoff, werden sie leicht in Lösung gebracht (14).

Die Struktur der reifen Kollagenfibrille ist im Tropokollagen also bereits angelegt, während Quervernetzungen, welche die Unlöslichkeit des reifen Kollagens bedingen, hier noch nicht ausgebildet sind.

Neben diesen natürlichen Vorstufen des Kollagens wurden künstliche Formen beobachtet, deren Entstehen durch die Arbeiten von Schmitt und Hodge (15), sowie von Kühn, Graßmann und Hofmann (16) in befriedigender Weise geklärt werden konnte. Es handelt sich um die sogenannten long-spacing Segmente (SLS) und um die long-spacing-Fibrillen (FLS). Erstere bilden sich in Form kurzer Faserstückchen nach Zusatz von ATP oder Nucleinsäuren zu Kollagenlösungen, während die long-spacing Fibrillen durch stark saure Polysaccharide wie Heparin, Chondroitinsulfat oder Hyaluronsäure zur Abscheidung gebracht werden können. Beide Formen entstehen durch verschiedenartige Zusammenlagerung der Tropokollagenmoleküle. In den $2.800 \text{ \AA}$ langen Segmenten (SLS) orientieren sich die polaren Tropokollagenmoleküle parallel, mit den Enden abschneidend, nebeneinander.

In den long-spacing Fibrillen (FLS) mit einer Periode von $2.800 \text{ \AA}$ und einem symmetrischen, vom normalen Kollagen grundsätzlich verschiedenen Querstreifungsmuster, sind die Tropokollagenmoleküle dagegen antiparallel angeordnet. Die normale Kollagenfaser mit einer Querstreifungsperiode von $650 \text{ \AA}$ entsteht aus Tropokollagenmolekülen, die jeweils um ein Viertel ihrer Länge gegeneinander versetzt zusammengelagert sind. Der experimentelle Nachweis zu dieser zuerst von Schmitt, Gross und Highberger (17) vorgeschlagenen Deutung wurde von Kühn (16b) durch photometrische Analyse des Querstreifungsmusters von SLS erbracht.

Deutung, wird das Zustandekommen dieser Querstreifung am besten dadurch erklärt, dass die dunklen Banden die ungeordneten Bereiche der Faser darstellen, in denen vorwiegend schwere und polare Aminosäuren mit sperrigen Resten angehäuft sind, während die hellen Querstreifen die geordneten Bereiche repräsentieren, die sich vorwiegend aus leichten, sich besser in eine kristalline Struktur fügenden Aminosäuren wie Glycin, Prolin und Oxyprolin zusammensetzen.

Eingehende Untersuchungen von Kühn, Graßmann und Hofmann (10) sowie von Kühn und Gebhardt (11) an Kollagen mit systematisch veränderten sauren und basischen Seitenketten haben gezeigt, dass das Phosphorwolframsäureanion von den basischen Gruppen, vor allem den Guanidogruppen des Arginins gebunden wird, während das Uranyl- und das Chrom III-Kation mit den sauren Resten - vor allem den freien Carboxylgruppen der Asparagin- und Glutaminsäure - reagiert.

Danach sind an bestimmten Stellen des Tropokollagenmoleküls vorwiegend basische, an anderen Stellen dagegen vorwiegend saure Aminosäuren angehäuft. Die beobachtete Kontrastverschärfung lässt sich auf ein "in Register bringen" der Polypeptidspiralen, also auf eine Fixierung und Verbesserung des in der Fibrille bereits vorgegebenen Ordnungszustandes zurückführen, wobei die Veränderung der Massendicke durch das Einlagern schwerer Metalle eine wesentlich geringere Rolle zu spielen scheint.

Das Tropokollagen

Während über die Biosynthese der Primärstruktur (103) des Kollagens noch wenig bekannt ist, ist das lösliche Monomere des Kollagens, das sogenannte Tropokollagen, sehr gut untersucht. Soweit Tropokollagen im Organismus noch in gelöster Form vorliegt, lässt es sich aus jugendlichem Gewebe in der Kälte mit neutraler Kochsalzlösung (12) extrahieren. Ein weit grösserer, bereits in Form von Fibrillen enthaltener Anteil ist mit verdünnten Säuren oder schwach sauren Puffern (13) z.B. aus der Haut von Kälbern extrahierbar. Dieser Anteil wurde nach einem Vorschlag von Orechowitsch ursprünglich Prokollagen genannt. Inzwischen ist man übereingekommen, beide löslichen Kollagen-

B. Zusammenfassung der Ergebnisse

Vorliegende Arbeit stellt einen Versuch dar, durch eine Reihe verschiedener chemischer Veränderungen an den funktionellen Gruppen des Kollagens zur Klärung einiger Probleme beizutragen, die sich im Verlauf der letzten Jahre aus den Untersuchungen unseres, sowie zahlreicher anderer Arbeitskreise ergeben hatten.

Die Ergebnisse lassen sich im einzelnen wie folgt zusammenfassen:

- 1.) Es wurde versucht, die ϵ -Aminogruppen des Lysins im Kollagen mit mercaptogruppenhaltigen Substituenten zu besetzen und sie durch Einführung von Schwermetallen elektronenmikroskopisch zu lokalisieren. Bei der Suche nach geeigneten Acylierungsmitteln gelang erstmals die Darstellung des cyclischen Anhydrids der Dithiodiglykolsäure. Nach Ausarbeitung geeigneter Reaktionsbedingungen an Modellsubstanzen gelang es, durch Umsetzung von Kollagen mit Dithiodiglykolsäure-Dichlorid sowie mit dem Anhydrid der Dithiodiglykolsäure und nachfolgender Reduktion der eingeführten Disulfidbrücken etwa 75% der ϵ -Aminogruppen des Kollagens durch den Thiolglykolsäurerest zu substituieren.
- Eine anschließende Einlagerung von Schwermetallen (Ag, Pb) durch Mercaptdibildung ergab jedoch im elektronenmikroskopischen Bild keine charakteristische Veränderung der Querstreuung.

- 2.) Eine Beteiligung von ϵ -Aminogruppen an Quervernetzungen konnte, wenn man von extrem kleinen Anteilen absieht, ausgeschlossen werden. In Gegenwart Wasserstoffbrücken sprengender Agentien liessen sich die ϵ -Aminogruppen des Kollagens quantitativ dinitrophenylieren.
- 3.) Zur Untersuchung der Frage, ob Kollagen Aminogruppen besitzt, wurde eine sehr empfindliche Verfeinerung der Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von α -Aminogruppen

5. b) Die Einwirkung von Hydroxylamin auf gelöstes, natives Tropokollagen hat keinen tiefgreifenden Abbau zur Folge. Man beobachtet lediglich eine gewisse Spaltung intramolekularer Quer-

5. a) Die Einwirkung von Hydroxylamin auf Tropokollagen und Kollagen in Gegenwart von LiCl führt unter denaturierenden Bedingungen zu einem sehr starken Abbau, der sich in einem Absinken des Mol.-Gewichtes auf etwa 10.000 bemerkbar macht. Demgegenüber kommt es jedoch zu keiner, dem Molekulargewicht entsprechenden Zunahme an Aminoendgruppen. Daraus wird geschlossen, dass Ester oder esterartige Bindungen innerhalb der Peptidkette liegen müssen. Nach den vorliegenden Ergebnissen entfallen auf eine α -Kette des Tropokollagens vom Molekulargewicht 100.000, je 6 esterartige Bindungen. Längere hydrolytische Einwirkung von Alkali (pH 9,55) führt zu einem langsamen Ansteigen der α -Aminoendgruppen.

4. b) Bei Einwirkung von Perjodat auf Kollagen treten gleichfalls nur in geringem Umfang Spaltungen der Peptidkette auf. Die Menge der feststellbaren Aminoendgruppen beträgt 0,27 Mol/1.000 Mol Aminosäuren. Sie wird unspezifischen, durch Hydrolyse bewirkten Spaltungen zugeschrieben.

4. a) Mit Hilfe der ausgearbeiteten Methode wurde festgestellt, dass die Einwirkung von Pepsin auf Kollagen geringe Spaltungen der Peptidkette zur Folge hat. Das Auftreten von etwa 0,3 Mol Endgruppen/1.000 Mol Aminosäuren wird auf die Abspaltung sogenannter Telopeptide zurückgeführt. Dieser Wert bleibt auch nach wiederholter Reinigung des Materials praktisch konstant.

Bei Anwendung dieser Methode auf Kollagen ergab sich, dass dieses keine freien α -Aminoendgruppen besitzt.

mittels Dinitrofluorbenzol entwickelt. Noch 0,05 Mol Endgruppen/1.000 Mol Aminosäuren lassen sich bequem nachweisen.

vernetzungen. Trypsineinwirkung verstärkt diesen Effekt.

Löst man festes Tropokollagen in 0,75 m Hydroxylamin, so tritt Kettenabbau ein. Man erhält Molekulargewichte von 30 - 40.000. Endgruppen sind nicht nachweisbar.

War das Tropokollagen nach der Hydroxylaminbehandlung der Einwirkung von Trypsin ausgesetzt, so treten geringe Mengen an Aminoendgruppen auf (0,76 Mol/1.000 Mol Aminosäuren), die durch Abspaltung von Telopeptiden durch das Enzym erklärt werden. In diesem Falle behält das Tropokollagen seine native Struktur.

5.c) Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Hydroxylamin- und Trypsin-behandeltem Tropokollagen führten zur Entdeckung einer neuen symmetrischen Form der SIS, die durch Abscheidung in Gegenwart von ATP bei pH 3,5 zustandekommt. Sie wird durch anti-parallele Zusammenlagerung der Tropokollageneinheiten erklärt.

6.) Bei der Untersuchung der Frage, ob β - und γ -Carboxylgruppen

der Asparagin-bezw. Glutaminsäure an Quervernetzungen beteiligt sind, wurde versucht, Hydroxamsäurekollagen nach Dinitro-

phenylierung nach Lossen abzubauen. Nach Gallop et al. sollte

sich hierbei Diaminopropionsäure bzw. Diaminobuttersäure bilden.

Die Versuche von Gallop et al. wurden unter zusätzlicher Ver-

wendung eigener Methoden nachgearbeitet. Eine Abnahme an

Asparaginsäure von 0,44 Mol/100 Mol Aminosäuren nach Lossen'schem

Abbau von Kollagen-Dinitrophenylhydroxamat konnte beobachtet

werden. Dies ist möglicherweise auf eine Beteiligung von

β -Carboxylgruppen der Asparaginsäure an Quervernetzungen

zurückzuführen. Eine Bildung von Diaminopropionsäure war jedoch

unter Bedingungen, bei welchen auch kleine Mengen hätten erfasst

werden müssen, nicht festzustellen. Die Ergebnisse von Gallop

et al. konnten damit nur zum Teil bestätigt werden.

- (1) J.T.Randall, J.Soc. Leather Trades' Chem. 38, 362 (1954)
- (2a) K.Kühn, W.Graßmann u. U.Hofmann, Z.Naturforschg. 13b, 1954 (1960)
- (2b) U.Hofmann, Th.Nemetschek u. W.Graßmann, Z.Naturforschg. 7b, 509 (1952)
- (3) H.Boedtker u. P.Doty, J.Amer.Chem.Soc. 78, 4267 (1956)
- (4) A.Rich u. H.H.C. Critch in "Recent Advances in Gelatine and Glue Research" (Herausg.G.Stainsby) S.20, Pergamon Press, London (1958)
- (5) C.E.Hall, M.A.Jakus u. F.O.Schmitt, J.Amer.Chem.Soc. 64, 1234 (1942)
- (6) C.Wolpers, Kln.Wochenschr. 22, 624 (1943; 23, 169 (1944)
- (7a) R.S.Bear, O.E.Bolduan u. T.P.Salo, J.Amer.Leather Chem.Assoc. 46, 107 (1951)
- (7b) R.S.Bear, Advances Prot. Chem. 7, 69 (1952)
- (8) W.Graßmann, K.Hannig, H.Endres u. A.Riedel, Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 306, 123 (1956)
- (9) Habilitationsschrift K.Kühn, Universität Heidelberg (1960)
- (10a) K.Kühn, U.Hofmann, W.Graßmann u. E.Gebhardt, Naturwiss. 45, 521 (1958)
- (10b) K.Kühn, W.Graßmann u. U.Hofmann, Z.Naturforschg. 13b, 154 (1958)
- (10c) K.Kühn, W.Graßmann u. U.Hofmann, Z.Naturforschg. 14b, 436 (1959)
- (10d) K.Kühn, U.Hofmann u. W.Graßmann, Naturwiss. 46, 512 (1959)
- (10e) K.Kühn, U.Hofmann u. W.Graßmann, Naturwiss. 47, 15 (1960)
- (10f) K.Kühn, Das Leder, 11, 110 (1960)
- (11) K.Kühn u. E.Gebhardt, Z.Naturforschg. 15b, 23 (1960)
- (12) J.Gross, J.H.Highberger u. F.O.Schmitt, Proc.Nat.Acad.Sci. 41, 1 (1955)
- (13a) J.Nageotte, Compt. Rend.Acad. Sci. 184, 115 (1927)
- (13b) W.N.Orechowitsch, A.A.Tustanowsky, K.D.Orechowitsch u. N.E. Plotnikowa, (Biokhimiya) (UDSSR) 13, 55 (1948)
- (14a) W.Graßmann, Das Leder 6, 241 (1955)
- (14b) K.Wolf, Dissertation München, (1956)
- (15) A.J.Hodge u. F.O.Schmitt, Proc.Nat.Acad.Sci. (USA) 46, 186 (1960)
- (16a) K.Kühn, W.Graßmann, U.Hofmann, Naturwiss. 47, 258 (1960)
- (16b) K.Kühn u. E.Zimmer, Z.Naturforschg., 16b, 648 (1961)

- (16c) K. Kuhn u. E. Zimmer, Naturwiss. 48, 219 (1961)
- (17) F. O. Schmitt, J. Gross u. J. H. Highberger, Symp. Soc. Exp. Biol. 9, 148 (1955)
- (18a) N. M. Wiederhorn u. G. V. Reardon, J. Polymer. Sci. 9, 315 (1952)
- (18b) P. J. Flory, J. Amer. Chem. Soc. 78, 5222 (1956)
- (18c) P. J. Flory u. O. K. Spurr Jr., J. Amer. Chem. Soc. 83, 1308 (1961)
- (19a) H. Hörmann, Das Leder 13, 79 (1962)
- (19b) M. Kienk, Dissertation München, (1960)
- (20) W. Graßmann, K. Wolf, Diskussionsbemerkung W. Graßmann zum Vortrag von J. Gross in "Connective Tissue" Blackwell Scient. Publ., Oxford, (1957) S. 45
- (21a) K. H. Gustavson, J. Amer. Leather Chem. Assoc. 50, 239 (1955)
- (21b) K. H. Gustavson, Sve. chem. Tidskr. 67, 116 (1955)
- (22a) A. Veis, J. Anesey u. J. Köhen, J. Amer. Leather Chem. Assoc. 55, 548 (1960)
- (22b) A. Veis, J. Anesey u. J. Köhen, Arch. of Biochem. Biophys. 94, 20 (1961)
- (23) P. Doty u. T. Nishihara, in: Recent Advances in Gelatin and Glue Research, Ed. G. Stainsby, Pergamon Press, London (1958) S. 92
- (24) W. Graßmann, K. Hannig u. J. Engel, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 324, 284 (1961)
- (25) P. M. Gallop, S. Seifter u. E. Meilman, Nature 183, 1659 (1959)
- (26) H. Hörmann, Das Leder 11, 173 (1960)
- (27) W. Graßmann, H. Schleich, Biochem. Z. 227, 320 (1935)
- (28) W. Graßmann, U. Hofmann, K. Kühn, H. Hörmann, H. Endres u. K. Wolf in: R. E. Tunbridge, Connective Tissue, S. 157; Blackwell, Oxford (1957)
- (29) W. Graßmann u. E. Zeschitz, Kollagen-Symposium, Weinheim (1957)
- (30) J. Gross, J. H. Highberger u. F. O. Schmitt, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 80, 462 (1952)
- (31) R. E. Glegg, D. Eidingger u. C. P. Leblond, Science (Lancaster) 118, 624 (1953)
- (32) W. Graßmann, H. Hörmann u. R. Hafter, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 307, 87 (1957)
- (33) R. Bangle u. W. C. Alford, J. Histochem. Cytochem. 2, 62 (1954)
- (34) W. Graßmann u. K. Kühn, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 301, 1 (1955)
- (35a) H. Hörmann u. G. Fries, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 311, 19 (1958)

- (35b) H. Hörmann, K. Hannig u. G. Fries, Hoppes-Seyler's Z. physiol. Chem. 315, 109 (1959)
- (36) H. Hörmann, A. Riedel, Th. Altmenschöffer u. M. Klenk, Das Leder 12, 175 (1961)
- (37a) K. H. Gustavson, Acta. Chem. Scand. 8, 1299 (1954)
- (37b) K. H. Gustavson, Nature, 175, 70 (1955)
- (37c) R. W. Green, K. R. Ang and L. C. Lam, Biochem. J. 54, 181 (1953)
- (38) J. H. Bowes u. J. A. Moss, Biochem. J. 55, 735 (1953)
- (39) M. Levy, L. Fishman u. G. Cabrera, Fed. Proc. 19, 343 (1960)
- (40) G. L. Mechanic u. M. Levy, J. Amer. Soc. 81, 1889 (1959)
- (41) T. Nishihara u. T. Miyata, Collagensymposium 3, 66 (1962)
- (42) K. Kühn, K. Hannig u. H. Hörmann, Das Leder 12, 237 (1961)
- (43) R. Hafter u. H. Hörmann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 330, 169 (1963)
- (44) A. L. Rubin, D. Pfahl, P. T. Speakman, P. F. Davison u. F. O. Schmitt, Science (Washington) 139, 37 (1963)
- (45) K. Kühn, P. Fietzek u. J. Kühn, Naturwissensch. 50, 444 (1963)
- (46a) F. Sanger, Biochem. J. 39, 507 (1945)
- (46b) R. R. Porter u. F. Sanger, Biochem. J. 42, 287 (1948)
- (47) Siehe Zusammenfassung im Aufsatz von F. Sanger in: Advances in Protein Chem., New York (1952), 7, S. 7
- (48) W. Graßmann u. H. Hörmann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 292, 24 (1953)
- (49) K. Th. Joseph, S. M. Bose, Bull. of Central Leather Research Inst. Vol. IV, No. 9 (1958)
- (50) Vergl. F. Sanger Advances in Protein Chem. 7, 1 - 67 (1952)
- (51a) A. Courts, Biochem. J. 58, 70 (1954)
- (51b) A. Courts, Biochem. J. 74, 238 (1960)
- (52) N. Narita, Biochem. Res. Commun. 5, 160 (1961)
- (53) K. Bailey, Biochem. J. 49, 23 (1961)
- (54) E. Margoliash, E. L. Shmiltz, G. Kreil, H. Tuppy, Nature 192, 1121 (1961)
- (55) K. Narita, Biochem. Biophys. Acta, 28, 184 (1958)
- (56) C. Deasy, J. Amer. Leather Chem. Assoc. 53, 203 (1958)
- (57a) S. Seifter, P. M. Gallop, S. Michaels u. E. Meilman, J. Biol. Chem. 235, 2613 (1960)
- (57b) P. M. Gallop, S. Seifter, M. Lukin u. E. Meilman, J. Biol. Chem. 235, 2619 (1960)

- (57c) O.O. Blumenfeld, P.M. Gallop, Biochem. ACS J, 947 (1962)
- (58) R. Andreasch, Monatshefte f. Chem., 18, 88 (1897)
- (59) R. Lesser u. A. Mehrländer, Ber. dtisch. Chem. Ges., 56, 1642 (1923)
- (60) J. M. Gulland, M. W. Partridge u. S. S. Randall, J. Chem. Soc. (1940) S. 419
- (61) K. H. Gustavson, Chemistry and Reactivity of Coll., Academic Press Inc. New York (1956 S. 112
- (62) D. R. Goddard u. L. Michaels, J. Biol. Chem., 106, 605 (1934)
- (63) R. E. Benesch u. R. Benesch, J. Am. Chem. Soc., 80, 1666 (1958)
- (64) A. J. Parker, N. Kharasch, Chem. Reviews, 59, 615 (1959)
- (65) A. Neuburger u. F. Sanger, Biochem. J., 37, 515 (1943)
- (66) M. Bergmann u. L. Zervas, Ber. dtisch. Chem. Ges., 65, 1192 (1932)
- (67a) V. DuVigneaud, L. F. Audrieth u. H. S. Loring, J. Amer. Chem. Soc., 52, 4500 (1930)
- (67b) V. DuVigneaud u. G. L. Miller, J. Biol. Chem., 116, 469 (1936)
- (68) C. M. Johnson und H. Nishita, Anal. Chem., 24, 736 (1952)
- (69a) D. H. Spackmann, W. H. Stein u. St. Moore, Anal. Chem., 30, 1190 (1958)
- (69b) K. Hannig, Chin. Chim. Acta 4, 51 (1959)
- (70) K. H. Gustavson, Nature 169, 757 (1952)
- (71) H. Zahn u. D. Wegerle, Das Leder 5, 121 (1954)
- (72a) A. Schöberl, Angew. Chem., 60, 7 (1948)
- (72b) A. Schöberl, Makromol. Chem., 37, 64 (1960)
- (73a) I. M. Klotz u. R. E. Heiney, J. Am. Chem. Soc., 81, 3802 (1959)
- (73b) I. M. Klotz u. R. E. Heiney, Arch. Biochem. Biophys., 96, 605 (1962)
- (74) F. Schade u. H. Zahn, Angew. Chem., 74, 904 (1962)
- (75) S. M. Rose, K. TH. Joseph, Arch. Biochem. Biophys., 74, 46 (1958)
- (76) J. J. Bethell, P. M. Gallop, Biochim. Biophys. Acta 45, 598 (1960)
- (77) R. L. Sykes, J. Soc. Leather Trades' Chemists 36, 267 (1952)
- (78a) W. Hausman, J. R. Weisiger u. L. C. Craig, J. Am. Chem. Soc., 77, 723 (1955)
- (78b) I. M. Lockhart u. E. P. Abraham, Biochem. J., 62, 645 (1956)
- (79) Diplomarbeit Th. Althenschöpf, München (1961)
- (80a) A. Levy u. C. Li, J. Biol. Chem., 213, 487 (1955)
- (80b) E. Mellon, A. Korn u. S. Hoover, J. Am. Chem. Soc., 75, 1675 (1953)
- (80c) W. A. Schroeder, L. M. Kay, J. Legette, L. R. Honnen u. F. C. Green J. Amer. Chem. Soc., 76, 3556 (1954)

- (81a) H.v. Portatius, Dissertation München (1960)
- (81b) W. Graßmann, H. Hörmann, H. v. Portatius, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 321, 120 (1960)
- (82) M. Brenner, A. Niederwieser u. G. Pataki, Experientia, 17, 145 (1961)
- (83a) H. v. Vunakis u. E. Brand, Abs. 119 th meeting Am. Chem. Soc. p. 28c (1951)
- (83b) P. Desnuelle, M. Rovey u. C. Fabre, Compt. rend. 233, 987 (1951)
- (83c) Symposia Soc. Exptl. Biol. IX, Cambridge University Press, 141 (1955)
- (84a) J. M. Creeth, Biochem. J. 51, 10 (1952)
- (84b) V. L. Koenigs u. J. D. Perring, Arch. Biochem. Biophys. 41, 367 (1952)
- (85) F. S. Steven u. G. R. Tristram, Biochem. J. 83, 245 (1962)
- (86) C. C. Solomon u. J. T. Irving, Biochem. J. 68, 499 (1958)
- (87) F. C. Green u. L. M. Kay, Analyt. Chem. 24, 727 (1952)
- (88a) W. A. Schroeder, J. Amer. Chem. Soc. 74, 5118 (1952)
- (88b) W. A. Schroeder u. L. R. Honnen, J. Amer. Chem. Soc. 75, 4615 (1953)
- (88c) W. A. Schroeder, L. R. Honnen u. F. C. Green, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 39, 23 (1953)
- (89) H. Hörmann, Vortrag auf dem Internat. Kollagen-Symposium, Scheveningen, Niederlande (1963)
- (90) J. W. Williams, W. M. Saunders u. J. S. Cicirelli, J. physic. Chem. 58, 774 (1954)
- (91) F. O. Schmitt u. A. J. Hodge, Das Leder 11, 74 (1960)
- (92a) E. J. Cohn u. J. T. Edsall, "Proteins, Amino Acids and Peptides as Ions and dipolar ions, New York (1943) S. 85
- (92b) Handbook of Chemistry and Physics, The Chem. Rubber Publ. Co., Cleveland (1963) S. 1761
- (93) K. Hannig, Z. Anal. Chem. 181, 244 (1961)
- (94) F. A. Rovey u. S. S. Yanari in P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, The Enzymes Vol. IV, S. 63 u. S. 75 f (1960)
- (95) P. M. Gallop, Biophys. Journal, New York, 4, Suppl. 79-92 (1964)
- (96) K. Kühn, Das Leder 14, 287 (1963)
- (97) W. Kordatzki, Taschenbuch der praktischen pH-Messung, München (1949) S. 46
- (98) E. C. Kendall, P. F. McKenzie u. H. L. Mason, J. Biol. Chem. 84, 657 (1929)
- (99) M. Bergmann, L. Zervas u. W. F. Ross, J. Biol. Chem. 111, 245 (1935)

- (100) R. Borasky u. G. C. Nutting, J. A. L. C. A., 154, 830 (1949)
- (101) P. M. Gallop, Arch. Biochem. Biophys., 54, 486 (1955)
- (102) W. Graßmann, J. Janicki, F. Schneider, Sztasny - Festschrift,
Darmstadt (1937), S. 74
- (103a) O. Snellman, Acta Chem. Scand., 17, 1057 (1963)
- (103b) G. Manner u. B. S. Gould, Biochim. Biophys. Acta 72, 243 (1963)
- (104) B. Blombäck u. R. F. Doolittle, Acta Chem. Scand., 17, 1816 (1963)

Lebenslauf

Am 8. Mai 1929 wurde ich als Sohn des Oberstleutnants a.D. Ludwig R. von Wilh und seiner Ehefrau Ada, geb. Havetta, einer Italienerin, in München geboren. Im Jahre 1934 starb mein Vater. Nach dem Besuch der Volksschule in München trat ich 1940 in die von Friedrich Wilhelm I. gegründete Potsdamer Kadettenanstalt und die damit verbundene Oberrealschule ein. Nach Ende des Krieges besuchte ich die Oberrealschule in Starnberg a. See und legte dort im Juni 1949 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1949/50 begann ich an der Universität München ein zweijähriges Studium der Literaturwissenschaften, Philosophie und Geschichte. Nach diesem ausgedehnten Studium generale begann ich im Wintersemester 1951/52 in München meine Berufsausbildung mit dem Studium der Chemie. Im Dezember 1955 legte ich das Diplomchemiker-Vorexamen und im April 1959 die Hauptprüfung ab. Im Juni 1959 begann ich am Max-Planck-Institut für Elweis- und Lederforschung, wo ich seit Juni 1960 als Hilfsassistent beschäftigt war, mit der Diplomarbeit, die als Kapitel I in diese Dissertation aufgenommen wurde. Die vorliegende Arbeit war im September 1963 experimentell abgeschlossen.

